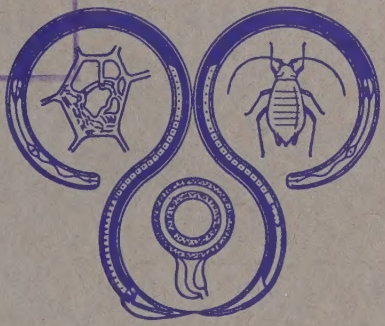
TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN

COMMONWEALTH INST
ENTOMOLOGY LIBRARY
17 APR 1957
SERIAL Eu.86
SEPARATE

JAARGANG 62 - 1956

6e AFLEVERING



Uitgave van de

NEDERLANDSE PLANTENZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Onder Redactie van

Mej. H. L. G. DE BRUYN; Dr. J. A. A. M. H. GOOSSENS;
Prof. Dr. A. J. P. OORT; Mej. F. QUAK; Dr. J. P. H. VAN DER WANT
en Dr. H. J. DE FLUITER (Secretaris)

Redactie-adres: Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek,
Binnenhaven 4*a*, Wageningen

BESTUUR

VAN DE NEDERLANDSE PLANTENZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Dr. J. G. ten Houten, Wageningen, *Voorzitter*
Ir. J. A. J. Veenenbos, Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, *Secretaris*
Dr. P. A. van der Laan, Marterlaan 18, Wageningen-Hoog (post Bennekom), *1e Penningmeester.* Postrekening no. 346310 ten name van Penningmeester van de Nederlandse Plantenziektenkundige Vereniging te Wageningen
Mej. F. Quak, Binnenhaven 4a, Wageningen, *2e Penningmeesteresse*
A. van Herwijnen, St. Pancras
Dr. Ir. C. Mastenbroek, Hoofddorp
Prof. Dr. A. J. P. Oort, Wageningen
P. Smeding, Leeuwarden

Lidmaatschap Ned. Plantenziektenkundige Vereniging

Nederland, Indonesië, Suriname en Curaçao f 7,50, België f 7,50, Buitenland f 8,50. Leden ontvangen het tijdschrift gratis.

Abonnement Tijdschrift

Nederland, Indonesië, Suriname en Curaçao f 10,—, België f 10,—. Buitenland f 13,—. Betalingen op postrekening 346310 t.n.v. Penningmeester Ned. Plantenziektenkundige Vereniging te Wageningen.

Advertentiën

Prijzen per plaatsing: ¼ pag. f 12,50; ½ pag. f 20,—; ½ pag. f 30,—; 1 pag. f 55,—.
Bij 3 maal plaatsen van dezelfde advertentie 10 procent korting.
Bij 6 maal plaatsen van dezelfde advertentie 20 procent korting.

Voor plaatsing wende men zich tot de secretaris der Redactie-Commissie, p.a. Binnenhaven 4a, Wageningen, tel. 2151, of tot H. Veenman & Zonen, Wageningen, tel. 2242.

INHOUD Blz.

HOOFDARTIKELEN

Dr. Ir. A. P. Kole en P. J. J. Philipsen – Fysiologische specialisatie bij Plasmodiophora brassicae Woron. *With a summary: Physiological specialization of Plasmodiophora brassicae Woron.* 261

Edward K. Vaughan – A device for the rapid removal of tannins from virus infected plant tissues before extraction of inoculum. *Met een samenvatting: Een methode voor de snelle verwijdering van looistoffen uit viruszieke plantedelen* 266

Edward K. Vaughan – Attempts to transfer Rubus and Fragaria viruses into herbaceous hosts. *Met een samenvatting: Pogingen om virussen van framboos en aardbei op kruidachtige planten over te brengen* 271

J. C. Mooi – Knolaantasting bij enkele aardappelrassen door Colletotrichum atramentarium. *With a summary: A disease, caused by Colletotrichum atramentarium, in tubers of certain potato varieties* 274

Ir. H. A. van Hoof – Verschil in reactie van wilde sla ten opzichte van besmetting met het slamozaïekvirus. *With a summary: Differences in reaction of wild lettuces with regard to infection by Lactuca virus 1* 285

Dr. B. H. H. Bergman – Het mozaïek I en de heksenbezemziekte van de aardnoot (Arachis hypogaea L.) in West-Java en hun vector, de jasside Orosius argentatus (Evans). *With a summary: Mosaic I and witches' broom disease of the groundnut (Arachis hypogaea) in West-Java and their vector, Orosius argentatus* 291

P. A. van der Laan – Onderzoekingen over schimmels, die parasiteren op de cysteinhoud van het aardappelcystenaaltje (*Heterodera rostochiensis* Wollenw.). *With a summary: Investigations on fungi, predacious on the cyst contents of the potato root eelworm (Heterodera rostochiensis Wollenw.)* 305

Vervolg inhoud pag. 3 omslag

T. Pl.ziekten 62 (1956): 261–265

FYSIOLOGISCHE SPECIALISATIE BIJ *PLASMODIOPHORA BRASSICAE* WORON.

With a summary:
Physiological specialization of Plasmodiophora brassicae Woron.

DOOR

Dr. Ir. A. P. KOLE en P. J. J. PHILIPSEN
Laboratorium voor Phytopathologie, Landbouwhogeschool, Wageningen

INLEIDING

In 1954 werden door Dr. J. C. s' JACOB (mondelinge mededeling)[1]) stoppelknollen en kool onderzocht op hun vatbaarheid voor knolvoet. De proeven werden uitgevoerd op een perceel „koolgrond" (klei) in Koedijk (N.H.) en op een perceel „stoppelknollengrond" (zand) in Nijbroek (N.O. Veluwe). Op de koolgrond werden vatbare koolsoorten zeer hevig, vatbare stoppelknollen daarentegen zeer weinig aangetast; op de stoppelknollengrond werden beide gewassen ernstig aangetast, maar kool in iets mindere mate dan stoppelknollen. Vermoedelijk waren hier twee fysiologische rassen van de ziekteverwekker in het spel, waarvan het ene, nader aangeduid als „herkomst stoppelknollen", zowel kool als stoppelknollen aantast, terwijl het andere, „herkomst kool", wel kool aantast, maar stoppelknollen slechts in zeer geringe mate. De juistheid van deze veronderstelling werd nader onderzocht in een proef met beide herkomsten van de ziekteverwekker.

WERKWIJZE

De proef werd uitgevoerd in acht gedraineerde, kubusvormige, betonnen bakken met zijden van 80 cm. Vier van deze bakken, welke in de grond waren ingegraven, werden gevuld met kleigrond en vier met zandgrond. Van twee bakken met klei en twee met zand werd de grond besmet met rustsporen van *P. brassicae* afkomstig van kool uit Koedijk. Dit gebeurde door in het najaar van 1954 wortelresten van aangetaste koolplanten op de grond in de bakken te brengen, deze wortelresten gedurende de winter te laten verrotten en in juni d.a.v. met de hand fijn te maken. Vervolgens werd de grond oppervlakkig bewerkt. De grond in de andere vier bakken werd op dezelfde wijze besmet met rustsporen afkomstig van stoppelknollen uit Nijbroek. In alle bakken werden op 15 juni één rij bloemkool (Lecerf) en één rij stoppelknollen (Vega) gezaaid (1e zaaisel). Op 23 augustus werden alle planten gerooid en beoordeeld op aantasting. Direct na het rooien werd de grond licht bewerkt en opnieuw op dezelfde wijze ingezaaid (2e zaaisel). De planten van dit tweede zaaisel werden op 20 november gerooid en beoordeeld. Bij de beoordeling golden de volgende maatstaven:

[1]) De auteurs zijn Dr. J. C. s' JACOB, Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, veel dank verschuldigd voor het verstrekken van deze gegevens.

bloemkool *cauliflower*

0 = geen aantasting *no infection*
1 = enkele kleine verdikkingen aan de wortels *roots with a few small swellings*
2 = enige verdikkingen aan de wortels *roots with some swellings*
3 = verscheidene verdikkingen aan de wortels *roots with several swellings*
4 = alle wortels verdikt (vingers) *all roots swollen (fingers)*
5 = het wortelstelsel één grote wrat *roots greatly disfigured*

stoppelknollen *turnip*

0 = geen aantasting *no infection*
1 = enkele wratjes op de staart *a few small warts on the tap root*
2 = grote wratten op de staart *big warts on the tap root*
3 = afzonderlijke wratten op de knol *separate warts on the „bulb"*
4 = wratten op de knol lopen in elkaar over *warts on the „bulb" merging into each other*
5 = de gehele knol één wrat *„bulb" greatly disfigured*

RESULTATEN

De resultaten van de proef zijn weergegeven in tabel 1. In deze tabel is tevens per bak voor elk gewas het gemiddelde van de beoordelingscijfers vermeld.

TABEL 1. Infectieproef bij stoppelknollen en bloemkool met *P. brassicae* van tweeërlei herkomst.
Inoculation experiment on turnip and cauliflower with P. brassicae from two sources.

Herkomst van *P. brassicae* *Source of P. brassicae*	Grondsoort *Soil type*	Gewas *Crop*												
		Stoppelknollen *Turnip*							Bloemkool *Cauliflower*					
		Aantal planten in elke beoordelingsklasse *Number of plants of each degree of infection*						Gem. beoord. cijfer *Mean degree of infection*	Aantal planten in elke beoordelingsklasse *Number of plants of each degree of infection*						Gem. beoord. cijfer *Mean degree of infection*
1e zaaistel *1st sowing*		0	1	2	3	4	5		0	1	2	3	4	5	
Kool *Cabbage*	Zand *Sand*	11	6	–	–	–	–	0,4	–	–	–	7	7	8	4,0
	„	11	–	–	–	–	–	0,0	–	–	–	–	–	21	5,0
	Klei *Clay*	15	–	–	–	–	3	0,8	–	–	–	–	4	18	4,8
	„	19	1	–	–	–	–	0,0	–	–	–	8	12	5	3,4
Stoppelknollen *Turnip*	Zand *Sand*	–	–	–	–	1	17	4,9	–	–	–	2	2	13	4,6
	„	–	–	–	–	–	18	5,0	2	6	3	4	–	7	2,7
	Klei *Clay*	–	2	–	–	4	10	4,3	–	5	4	14	–	3	2,7
	„	–	–	–	–	–	19	5,0	–	2	–	12	–	2	3,0
2e zaaisel *2nd sowing*		0	1	2	3	4	5		0	1	2	3	4	5	
Kool *Cabbage*	Zand *Sand*	44	–	–	–	–	–	0,0	4	–	–	3	2	3	2,7
	„	80	–	2	–	–	2	0,2	24	4	–	1	10	10	2,0
	Klei *Clay*	87	–	–	4	–	7	0,5	13	–	3	–	18	1	2,4
	„	46	–	–	–	–	–	0,0	16	–	–	–	–	–	0,0
Stoppelknollen *Turnip*	Zand *Sand*	4	–	–	–	–	115	4,8	21	6	1	6	11	33	3,0
	„	3	–	–	–	–	75	4,8	13	8	–	–	7	14	2,5
	Klei *Clay*	11	–	4	2	3	12	2,7	79	–	–	–	–	3	0,2
	„	6	–	6	–	–	44	4,2	20	3	–	–	7	12	2,2

Uit de variantieanalyse van de gemiddelden der beoordelingscijfers bleek [1]), dat de effecten van herkomst, van wisselwerking tussen gewas en herkomst, van zaaitijd en van wisselwerking tussen gewas en zaaitijd zeer duidelijk aanwezig waren, terwijl voor de aanwezigheid van de effecten van gewas en van wisselwerking tussen zaaitijd en de wisselwerking van gewas en van herkomst aanwijzingen bestonden. Voegt men de componenten herkomsteffect, gewaseffect, zaaitijdeffect, effect van wisselwerking tussen herkomst en gewas, effect van wisselwerking tussen gewas en zaaitijd en tenslotte het effect van wisselwerking van de zaaitijd met de herkomst/gewasinteractie bij elkaar, dan krijgt men het onderstaande schema van gezamenlijke werkingen (tabel 2):

TABEL 2

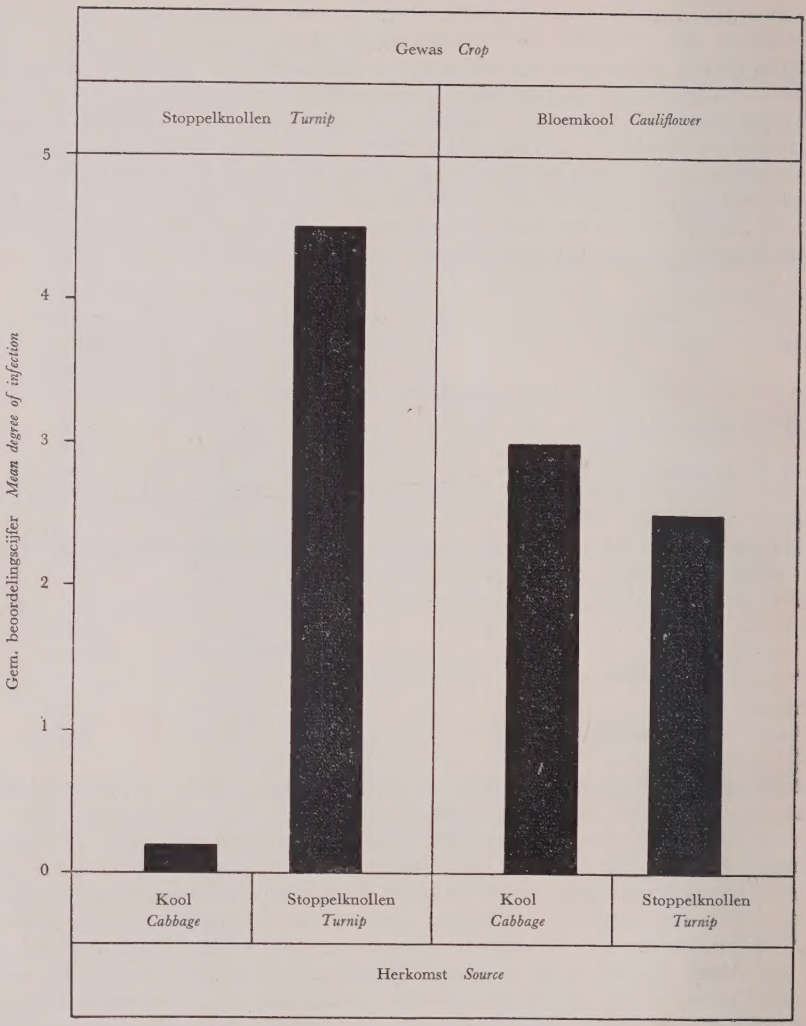
	Gewas stoppelknollen	Gewas bloemkool
1e zaaisel herkomst kool	0,22	4,22
„ stoppelknollen	4,88	3,36
2e zaaisel herkomst kool	0,26	1,86
„ stoppelknollen	4,04	1,88

Ziet men af van de invloed der zaaitijden, dan blijkt uit de gemiddelden van de verschillende herkomst- en gewascombinaties in tabel 2:

	Gewas stoppelknollen	Gewas bloemkool
Herkomst kool	0,24	3,04
„ stoppelknollen	4,46	2,62

dat het gewas stoppelknollen door de herkomst kool slechts in zeer geringe mate werd aangetast, daarentegen zeer hevig door de herkomst stoppelknollen. Het gewas bloemkool werd door beide herkomsten ernstig aangetast; door herkomst stoppelknollen echter in iets mindere mate dan door herkomst kool. Bij splitsing naar de zaaitijden (tabel 2) blijkt de zojuist beschreven wisselwerking tussen herkomst en gewas in sterkere mate op te treden bij het eerste zaaisel dan bij het tweede. Dit verschijnsel, evenals een lagere gemiddelde aantasting bij het tweede zaaisel en de gewas/zaaitijdinteractie, vinden voornamelijk hun oorzaak in een sterke daling van de mate van aantasting van het gewas bloemkool, dat bij het tweede zaaisel bovendien door beide herkomsten ongeveer even sterk werd aangetast. Bij het tweede zaaisel blijkt ook de aantasting van stoppelknollen door herkomst stoppelknollen iets minder te zijn dan bij het eerste. In de geringe aantasting van stoppelknollen door de herkomst kool kwam bij het tweede zaaisel geen verandering. Van de factor grondsoort en van alle mogelijke andere interacties kon de werking niet worden aangetoond. In grafiek 1 is de gemiddelde aantasting van de gewassen stoppelknollen en bloemkool door de twee herkomsten van *P. brassicae* weergegeven.

[1]) De auteurs zijn Ir. L. C. A. CORSTEN, Afd. Wiskunde en Statistiek van de Landbouwhogeschool, zeer erkentelijk voor de wiskundige verwerking van de waarnemingsuitkomsten.



GRAFIEK 1. Infectieproef bij stoppelknollen en bloemkool met *P. brassicae* van tweeërlei herkomst.
Inoculation experiment on turnip and cauliflower with P. brassicae from two sources.

SAMENVATTING EN BESPREKING

In verband met aanwijzingen voor fysiologische specialisatie bij *P. brassicae* werd de invloed onderzocht van de herkomst van het infectiemateriaal (kool uit Koedijk, stoppelknollen uit Nijbroek) op de mate waarin bloemkool (Lecerf) en stoppelknollen (Vega) door knolvoet worden aangetast. De proef werd

tweemaal – éénmaal in de zomer en éénmaal in de herfst – in duplo uitgevoerd op twee grondsoorten (klei- en zandgrond).

Het gewas stoppelknollen werd sterk aangetast door *P. brassicae* afkomstig van stoppelknollen en zeer weinig door de schimmel afkomstig van kool. Bloemkool werd door beide herkomsten sterk aangetast; door de herkomst stoppelknollen echter in iets mindere mate dan door de herkomst kool. Uit deze resultaten blijkt dus, dat er inderdaad met twee fysiologische rassen van de schimmel is gewerkt.

Tot voor kort heeft men over het algemeen vrij sceptisch gestaan tegenover de mogelijkheid van fysiologische specialisatie bij *P. brassicae*. MACFARLANE (1955) heeft echter aan de hand van gegevens uit de literatuur en van eigen onderzoek duidelijk aangetoond, dat er wel degelijk fysiologische rassen van deze schimmel bestaan. Voor ons land wijzen SCHEIJGROND & VOS (1954) op de mogelijkheid van fysiologische specialisatie.

Het feit, dat er in ons land verschillende fysiologische rassen van *P. brassicae* voorkomen is van belang voor de veredeling van kruisbloemige gewassen op resistentie tegen knolvoet. Zolang niet bekend is welke fysiologische rassen dit zijn, dient het toetsen van kruisbloemige gewassen op hun resistentie voor knolvoet te geschieden op grond die met zoveel mogelijk verschillende herkomsten van de ziekteverwekker is besmet.

SUMMARY

In testing cruciferous crops for varietal resistance indications were obtained of the existence of two races of *P. brassicae* (verbal communication from Dr. J. C. s' JACOB, I.P.O., Wageningen). Further evidence was obtained in an inoculation experiment. This experiment was done in eight open, concrete containers, which were set into the soil. Four of these containers were filled with clay and four with sand. In the autumn of 1954 clubs from cabbage, grown in a field in Koedijk, were placed on the soil in two of the clay filled containers and two of the sand filled containers. Clubs from turnip, grown in a field in Nijbroek, were placed on the soil in the remaining four containers. In the spring of 1955 the residue of the clubs was pulverized and mixed with the upper layer of the soil. On June 15 one row of cauliflower and one row of turnip were sown in each container. The plants were lifted and examined August 23 (1st sowing). The experiment was repeated immediately and the plants of this second crop were lifted November 20 (2nd sowing). Turnip was heavily clubbed by *P. brassicae* originating from turnip and only slightly by the fungus originating from cabbage. Cauliflower was heavily affected by both sources; slightly less by the source „turnip" than by the source „cabbage". Thus the results of the experiment confirmed the existence of two races of *P. brassicae*. Where it is not known whether other races do occur, it is advised in breeding for resistence to use inocula of *P. brassicae* from as many sources as possible.

LITERATUUR

MACFARLANE, I. – 1955. Variation in *Plasmodiophora brassicae* Woron. Ann. appl. Biol. 43 (2): 297–306.

SCHEIJGROND, W. & VOS, H. – 1954. Investigation on the susceptibility to clubroot. Euphytica 3: 125–139.

T. Pl.ziekten 62 (1956): 266–270

A DEVICE FOR THE RAPID REMOVAL OF TANNINS FROM VIRUS INFECTED PLANT TISSUES BEFORE EXTRACTION OF INOCULUM[1] [2])

Met een samenvatting: Een methode voor de snelle verwijdering van looistoffen uit viruszieke plantedelen

BY

EDWARD K. VAUGHAN[3])

The difficulty of extraction of certain plant viruses in infectious form is believed to be due to the denaturing effect of tannins liberated in the course of juice extraction. During the grinding or pressing of the tissues the tannins, localized in vacuoles of living cells, become mixed with the elements of cytoplasmic origin and inactivate the viruses.

CORNUET (1) has suggested that this difficulty may be avoided by effecting a non-denaturing dehydration of the material through freeze-drying followed by washing with ethyl alcohol or chloroform. In either case it is essential that the solvent be completely anhydrous, otherwise it will itself inactivate the virus or bring it into contact with the denaturing tannins.

Ordinary methods of washing and centrifuging have two inherent disadvantages: too much time (4 to 8 hours) is required when 7–10 washings are needed, and there is always the danger of atmospheric moisture being taken up by the absolute alcohol during the extraction process. In an effort to speed the extraction and reduce the danger of moisture getting into the solvent the Soxhlet extraction apparatus was tested. However, the temperature in the cellulose extraction thimble was too high (55–60 °C with chloroform; 70–75 °C with alcohol) and would quickly have inactivated most plant viruses. Modifications of the apparatus, on the other hand, removed the difficulties.

A water jacket (Fig. 1, 3) was placed around the chamber in which the cellulose thimble containing plant materials was to be placed, making it possible to keep the chamber at any desired temperature. To reduce the chances of absorbing moisture from the air a longer condensor (Fig. 1, 2) was built and a $CaCl_2$ trap (Fig. 1, 1) was added. Also, a test cock (Fig. 1, 4) was added to the siphon tube below the water jacket so that samples could be taken for testing with $FeCl_3$ without opening the apparatus or stopping the extraction. With this equipment, which was made at the Laboratory of Organic Chemistry, Landbouwhogeschool, from Pyrex glass, a rapid, repeated washing of the plant material was possible.

To determine whether such a device could be used in plant virus research,

[1]) Research carried on at the Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen, Nederland. Supported in part by a Fellowship from the John Simon Guggenheim Memorial Foundation, New York.

[2]) Approved for publication as Technical Paper No. 939 by the Director of the Oregon Agricultural Experiment Station. Contribution of the Department of Botany and Plant Pathology of this Station, and of the Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (I.P.O.), Wageningen.

[3]) Plant Pathologist, Oregon Agricultural Experiment Station, Corvallis, Oregon, U.S.A.

leaves of White Burley tobacco, infected with tobacco mosaic virus, and old leaves of commercial strawberry which were high in tannins, were freeze-dried, ground to a powder, and mixed at a rate of 1 gram tobacco leaf to 20 grams strawberry leaf. Inoculations with an extract from this mixture, using 10 ml of physiological salt solution per gram of dry powder, produced almost no local lesions on *Nicotiana glutinosa*. (The single instance when a few lesions were produced could have been the result of chance contamination.) The same extract gave color reaction with $FeCl_3$ comparable with a 0.9 % solution of tannic acid.

When the solvent (absolute alcohol or chloroform) had been brought to a rapid distillation, the condensor was momentarily separated from the extraction unit, and a cellulose extraction thimble containing the tobacco-strawberry mixture was inserted. When very small quantities of material were used, a more frequent washing was achieved by filling the extraction chamber part way with sterile glass beads, leaving just enough space so the plant material was covered before the solvent siphoned into the distillation flask. If this was done, a small amount of spun glass was first added to the chamber to prevent a glass bead from blocking the entrance to the siphon tube.

Although tests with $FeCl_3$ indicated that all tannins could be removed from raspberry tissues in 20 minutes, strawberry tissues in 30 minutes, and tea tissues in 30–35 minutes, the extractions with alcohol were carried on for 20, 40, and 60 minutes, and with chloroform for 15, 30, and 45 minutes. At the end of the period the extraction thimble was removed from the apparatus and the powdered leaf mixture was dried rapidly in a vacuum in a desiccator containing P_2O_5 if alcohol was used as the solvent. When chloroform was used, the mixture dried very rapidly in the air and was then transferred to the desiccator.

When all lots had been dried, 1 gram of each was ground in a mortar with 10 grams physiological salt solution, allowed to stand for 6 hours at 20 °C, then centrifuged at 7000 r.p.m. for 20 minutes. The natant solutions were then tested for infectivity and serological activity.

Detached leaves of *Nicotiana glutinosa* were inoculated with the above extracts, using dilutions of 1–100, 1–1000, and 1–10,000. Inoculated leaves were stored in moist chambers under continuous illumination and a temperature of approximately 20 °C for 48 hours, after which the numbers of local lesions were determined. In subsequent tests with potato virus-X, *Gomphrena globosa* leaves were inoculated with dilutions of 1–10, 1–100, and 1–1000, and counts were made after 7 days.

In all serological tests micro-drops were placed on Formvar treated plates and covered with paraffin oil to prevent drying (2). Each extract was tested at dilutions of 1/10, 1/30, 1/90, 1/270, 1/810, and 1/2430. Suitable checks with normal serum and with extract from healthy White Burley tobacco were maintained in all cases. Precipitation reactions were determined after 24 hours at approximately 20 °C.

Fig. 1. Modified Soxhlet extraction apparatus, showing $CaCl_2$ trap (1), extended condensor (2), water jacket around extraction chamber (3), and test cock on siphon tube (4).

Gewijzigd Soxhlet-apparaat voor de extractie van looistoffen uit virushoudend plantemateriaal.

TABLE 1. Effect of tannin extraction with absolute alcohol or chloroform on infectivity of tobacco mosaic virus

Tabel 1. Effect van de extractie der looistoffen met absolute alcohol of chloroform op het infectievermogen van tabaksmozaïekvirus

Inoculum from tobacco-strawberry tissue mixture after removal of tannins with *Inoculum van een mengsel van tabaks- en aardbeiblad na verwijdering van de looistoffen met*	Dilution of inoculum *Verdunning van inoculum*		
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
	Number local lesions per leaf[1]) *Aantal vlekjes per blad*[1])		
Alcohol for 20 minutes	132	81	45
„ „ 40 „	109	65	10
„ „ 60 „	218	101	12
Chloroform for 15 minutes	181	59	17
„ „ 30 „	254	99	60
„ „ 45 „	189	94	30
Control-Tannins not extracted *Controle-Looistoffen niet verwijderd*	2	0	0
Control-No strawberry tissue *Controle-Zonder aardbeiblad*	239	120	49

[1]) Average of 4 replications.
Gemiddelde van 4 herhalingen.
Decimals have been omitted.
Decimalen zijn weggelaten.

TABLE 2. Effect of tannin extraction with absolute alcohol or chloroform on serological activity of tobacco mosaic virus [1])

Tabel 2. Effect van de extractie der looistoffen met absolute alcohol of chloroform op de serologische activiteit van tabaksmozaïekvirus [1])

Extracts from tobacco-strawberry tissue mixture after removal of tannins with *Extracten van een mengsel van tabaks- en aardbeiblad na verwijdering van de looistoffen met*	Dilution of extract[2]) *Verdunning van het extract*[2])					
	1/10	1/30	1/90	1/270	1/810	1/2430
	Strength of reaction expressed in numbers[3]) *Sterkte van de reactie in een getal uitgedrukt*[3])					
Alcohol for 20 minutes	16	13	9	4	1	–
„ „ 40 „	16	13	7	–	–	–
„ „ 60 „	16	16	7	2	–	–
Chloroform for 15 minutes	16	16	9	7	2	1
„ „ 30 „	16	16	8	7	3	1
„ „ 45 „	16	16	12	6	2	–
Control – No strawberry tissue *Controle – Zonder aardbeiblad*	16	16	16	9	4	1

[1]) Average of 4 replications.
Gemiddelde van 4 herhalingen.
[2]) Serum dilution 1/10 throughout.
Serumverdunning steeds 1/10.
[3]) Smallest observable reaction 1; very strong reaction 16 (See text).
1: reactie nog net zichtbaar; 16: zeer sterke reactie.
Decimals have been omitted.
Decimalen zijn weggelaten.

TABLE 3. Effect of tannin extraction with absolute alcohol or chloroform on infectivity of potato virus-X

Tabel 3. Effect van de extractie der looistoffen met absolute alcohol of chloroform op het infectievermogen van aardappel-X-virus

Inoculum from tobacco-strawberry tissue mixture after removal of tannins with *Inoculum van een mengsel van tabaks- en aardbeiblad na verwijdering van de looistoffen met*	Dilution of inoculum *Verdunning van inoculum* 10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
	Number local lesions per leaf[1]) *Aantal vlekjes per blad*[1])		
Alcohol for 20 minutes	14	4	0
„ „ 40 „	11	3	2
„ „ 60 „	10	1	1
Chloroform for 15 minutes	16	6	3
„ „ 30 „	11	7	1
„ „ 45 „	14	4	2
Control – Tannins not extracted *Controle – Looistoffen niet verwijderd*	0	0	0
Control – No strawberry tissue *Controle – Zonder aardbeiblad*	17	8	3

[1]) Average of 4 replications.
Gemiddelde van 4 herhalingen.

Decimals have been omitted.
Decimalen zijn weggelaten.

TABLE 4. Effect of tannin extraction with absolute alcohol or chloroform on serological activity of potato virus-X[1])

Tabel 4. Effect van de extractie der looistoffen met absolute alcohol of chloroform op de serologische activiteit van aardappel-X-virus[1])

Extracts from tobacco-strawberry tissue mixture after removal of tannins with *Extracten van een mengsel van tabaks- en aardbeiblad na verwijdering van de looistoffen met*	Dilution of extract[2]) *Verdunning van het extract*[2]) 1/10	1/30	1/90	1/270	1/810
	Strength of reaction expressed in numbers[3]) *Sterkte van de reactie in een getal uitgedrukt*[3])				
Alcohol for 20 minutes	14	9	4	1	–
„ „ 40 „	15	7	4	–	–
„ „ 60 „	11	9	3	1	–
Chloroform for 15 minutes	16	16	7	4	1
„ „ 30 „	16	14	9	2	–
„ „ 45 „	13	12	6	4	1
Control – No strawberry tissue *Controle – Zonder aardbeiblad*	16	16	9	8	1

[1]) Average of 4 replications.
Gemiddelde van 4 herhalingen.

[2]) Serum dilution 1/10 throughout.
Serumverdunning steeds 1/10.

[3]) Smallest observable reaction 1; very strong reaction 16 (See text).
1: reactie nog net zichtbaar; 16: zeer sterke reactie.

Decimals have been omitted.
Decimalen zijn weggelaten.

In reading the serological tests the smallest visible reaction was given the numerical value of 1, a moderate precipitate a value of 4, a heavy precipitate a value of 9, and a very heavy precipitate a value of 16. Since the precipitates observed extended in a horizontal plane, the squares of the numbers 1 to 4 respectively present a more accurate interpretation of the strength of the reaction than the numbers themselves.

The results indicate that with a stable virus like tobacco mosaic virus, there is no appreciable loss in either infectivity or serological activity as a result of extraction period of as much as an hour with absolute ethyl alcohol or 45 minutes with chloroform (Tables 1 and 2). Tests using tobacco leaves infected with potato virus-X showed correspondingly slight losses of virus infectivity or serological activity (Tables 3 and 4).

The modification of the Soxhlet extraction apparatus seems to be a satisfactory device for the removal of tannins from plant tissues infected with certain relatively stable viruses.

The author wishes to express his sincere thanks to Prof. Dr. T. H. THUNG and Mr. H. W. J. RAGETLI for their cooperation in planning the tests and securing the equipment, to Dr. J. G. TEN HOUTEN of the Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen, for the use of the facilities that made these tests possible, and to Dr. J. P. H. VAN DER WANT for adding the Dutch summary.

SAMENVATTING

Sommige plantesoorten bevatten looistoffen, waarvan wordt aangenomen, dat zij de overbrenging met sap van in deze plantesoorten voorkomende virussen verhinderen. In dit artikel wordt een methode beschreven, waarmee deze looistoffen vooraf uit plantemateriaal kunnen worden verwijderd. Het looistofbevattende blad wordt, na snel diepgevroren en gedroogd te zijn, in een gewijzigd Soxhlet-apparaat (Fig. 1) met alcohol of chloroform uitgetrokken. Aldus scheidt men de looistoffen kwantitatief van het virus.

Het effect van de extractie der looistoffen of de virusactiviteit werd nagegaan door mengsels van tabaksbladeren, respectievelijk geïnfecteerd met tabaksmozaïekvirus en aardappel-X-virus, en aardbeibladeren volgens de beschreven methode van looistoffen te ontdoen en daarna het infectievermogen van deze virussen of *Nicotiana glutinosa*, respectievelijk *Gomphrena globosa*, te toetsen (Tabellen 1 en 3). Tevens werd de serologische activiteit van de aldus van tannine bevrijde virussen bepaald (Tabellen 2 en 4).

Uit de verstrekte gegevens blijkt, dat het tabaksmozaïekvirus en het aardappel-X-virus nagenoeg zonder verlies aan infectievermogen of serologische activiteit uit het mengsel met aardbeiblad kunnen worden geïsoleerd.

LITERATURE

1. CORNUET, P. – 1952. Sur l'extraction et l'inoculation par voie mécanique de certains virus affectant les fraisiers. C. R. Acad. Sci. (Paris) 235: 271–273.
2. SLOGTEREN, D. H. M. VAN – 1955. Serological micro-reactions with plant viruses under paraffin oil. Proc. Int. Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, 25–29 June, 1954: 51–54.

T. Pl.ziekten 62 (1956): 271–273

ATTEMPTS TO TRANSFER *RUBUS* AND *FRAGARIA* VIRUSES INTO HERBACEOUS HOSTS[1] [2])

Met een samenvatting: Pogingen om virussen van framboos en aardbei op kruidachtige planten over te brengen

BY

EDWARD K. VAUGHAN[3])

The identification of virus diseases of raspberry and blackberry by the expression of symptoms, even in a single locality, is a slow and uncertain process. Since symptoms are determined by many factors (such as temperature, brilliance, quality and period of illumination, nutrition, injuries caused by storms, insects, cultivating and harvesting, and the variety and age of plant) most of which cannot be controlled, a means for the rapid, positive identification of the viruses themselves, independent of the host plant is needed.

The ultimate purpose of these investigations at the Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen, of which only the preliminary phases are reported in this paper, was to determine whether it was possible to produce antisera for the mosaic types of *Rubus* viruses and for some strawberry viruses.

The following disease types were selected because they appeared to be characteristic of the types of virus diseases in raspberries in Holland, and because the plants could be tagged and kept available for use as desired.

1. Rubus stunt. Variety Malling Jewel. Sint Walfriedschool, Breda.
2. Mild green mosaic. Variety Bodenia. I.V.T., Wageningen.
3. Severe leaf curling mosaic. Variety Superlative. I.V.T., Wageningen.
4. Yellow mosaic. Variety Nordmark. I.V.T., Wageningen.

5*a*. Severe mottle mosaic. Variety Goliath. I.V.T., Wageningen.

5*b*. Severe mottle mosaic. Variety Lensiana (tetraploid?) I.V.T., Wageningen.

The strawberry viruses, all obtained from Dr. DE FLUITER at I.P.O., Wageningen, were designated by him A_2l, 19VIIb, C_4l, and 200Ia, respectively.

It was obvious that if antisera were to be produced, the viruses must first be transferred to some succulent tannin-free host, such as cucumber, tomato, tobacco or *Gomphrena globosa*, in which a high concentration of virus might be produced.

DIRECT MECHANICAL INOCULATION

Since mechanical transmission of the Rubus viruses using crude extracts and ordinary leaf rubbing techniques is impossible, various refinements of this method were tested. The youngest leaves of infected plants were crushed in a 0.1 M

[1]) Research carried on at the Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen, Nederland. Supported in part by a fellowship from the John Simon Guggenheim Memorial Foundation, New York.

[2]) Technical Paper No. 944 of the Oregon Agricultural Experiment Station. Contribution of the Department of Botany and Plant Pathology of this Station, and of the Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (I.P.O.), Wageningen.

[3]) Plant Pathologist, Oregon Agricultural Experiment Station, Corvallis, Oregon, U.S.A.

solution of Na_2HPO_4 or 10 per cent nicotine sulphate to prevent oxidation or denaturation of the virus. Although inoculations on *Gomphrena globosa*, *Amaranthus bicolor*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum*, cucumber, and tomato were made immediately after the extracts were made, all were unsuccessful.

Leaves were submerged in the solutions and placed in a vacuum of 0.4 mm Hg for five minutes to eliminate air from the leaves and to bring the anti-oxidants and antidenaturants into closer contact with the infected cells. As the pressure gradually returned to normal, the solutions flooded the intercellular spaces. Inoculations of the above mentioned plant species with extracts from these leaves also were unsuccessful.

Using leaves with the intercellular spaces flooded with nicotine sulphate or with phosphate buffer, the 'brush' technique described by YARWOOD (3) was used to inoculate leaves which had been sprayed with the same solution. These inoculations on *A. bicolor*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, cucumber, and tomato also were unsuccessful.

LYOPHILIZATION

Since the chances for direct mechanical transfer of any of the *Rubus* viruses seemed very slight, various modifications of the lyophilization technique of CORNUET (1) were employed. The objectives of the technique, which has been reported to be a satisfactory means for mechanical transfer of strawberry viruses, are to (a) remove the water from the tissues without giving the tannins a chance to denature the viruses, (b) remove the tannins with absolute alcohol without wetting the viruses, and (c) extract the viruses in water after both tannins and alcohol have been removed.

Infected leaves were cut into small pieces, not larger than 4 mm square, and placed in small lyophilization flasks. The flasks were then held in liquid air and a little liquid air was poured into each flask. By this method the leaf tissues were deep-frozen almost instantly. When all boiling of the liquid air had ceased, the flasks were attached to the condensor of the lyophilization apparatus and subjected to a vacuum of 0.1 to 0.03 mm Hg. With the temperature of the alcohol around the condensor at −15 to −25°C the leaf tissues were dried in 6 to 8 hours. The dried leaves were ground to a powder, mixed thoroughly with absolute alcohol, and centrifuged at 7000 rpm for 10 minutes. Eight successive extractions were required to remove all tannins from the tissues, the process taking most of a day. As soon as all tannins had been removed the powdered tissues were dried, then ground in a mortar with a phosphate buffer solution. All inoculations on *N. glutinosa*, *N. tabacum*, cucumber, tomato, *Datura stramonium*, and *Fragaria vesca* with these extracts were unsuccessful.

In subsequent tests means were devised for speeding both the lyophilization and the tannin extraction. Temperature of the alcohol around the condensor was kept at −50° to −55°C, and the lyophilization flasks were wrapped in envelopes of dry ice to prevent too rapid warming. After approximately an hour the dry ice had disappeared, and after two hours the insulation was removed and the flasks allowed to warm up gradually to room temperature. This procedure dried the leaf tissues in 4 to 5 hours.

The period required to remove tannins by repeated washing and centrifuging and the danger of inactivation of the viruses if water was taken up by the absolute alcohol, were both reduced by use of a modification of the Soxhlet extraction

apparatus (2). With this equipment and a small fraction of the amount of absolute alcohol required for repeated washings, all tannins could be removed from raspberry or strawberry tissues in 20 to 30 minutes. It was thus possible to start with fresh leaves in the morning and inoculate with tannin-free extracts in the afternoon. Nevertheless, all inoculations on *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *D. stramonium*, and cucumber were unsuccessful.

All of the above inoculations were made in late autumn. Since viruses often are present in greatest quantity, and can be transmitted with greatest ease in actively growing tissues, a final series of tests was conducted in the spring of 1955. Again the rapid freeze-drying and tannin extraction were employed, and all extracts were from the youngest tip leaves of severely affected plants. Because these inoculations on black raspberry seedlings, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *A. bicolor*, *G. globosa*, *D. stramonium*, tomato, and cucumber also failed, it was concluded that until new techniques had been devised, the viruses used in these studies could not be transmitted to tannin-free herbaceous plants, and the production of antisera for their identification and differentiation was therefore impossible. It is hoped that in the future methods will be found for transferring these viruses to suitable herbaceous hosts or for producing antisera directly from extracts of infected *Rubus* or *Fragaria* plants.

ABSTRACT

Attempts were made to transfer several types of viruses affecting *Rubus* and *Fragaria* species to herbaceous hosts of low tannin content. Despite use of phosphate buffers, nicotine sulphate solutions, and various lyophilization techniques, all inoculations were unsuccessful.

The writer wishes to express his sincere thanks to Prof. Dr. T. H. THUNG and his associates for their cooperation in planning and conducting the tests, to Dr. J. G. TEN HOUTEN of the Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen, for the use of the facilities that made the tests possible, and to Dr. J. P. H. VAN DER WANT for adding the Dutch summary.

SAMENVATTING

Er werden pogingen ondernomen, verschillende typen van mozaïekvirussen van framboos en van aardbei met sap op kruidachtige, weinig of geen looistoffen bevattende planten over te brengen. Er werd gebruik gemaakt van fosfaatbuffers, van oplossingen van nicotinesulfaat en van droogvries-methoden om vooraf de looistoffen uit het materiaal te verwijderen. De resultaten van de inoculatieproeven waren echter alle negatief.

LITERATURE

1. CORNUET, P. – 1952. Sur l'extraction et l'inoculation par voie mécanique de certains virus affectant les fraisiers. C. R. Acad. Sci. (Paris) 235: 271–273.
2. VAUGHAN, EDWARD K. – 1956. A device for the rapid removal of tannins from virus infected plant tissues before extraction of inoculum. T. Pl.ziekten: 000–000.
3. YARWOOD, C. E. – 1953. Quick virus inoculation by rubbing with fresh leaf discs. U.S. Dept. Agr. Pl. Dis. Reptr 37: 501–502.

T. Pl.ziekten 62 (1956): 274–284

KNOLAANTASTING BIJ ENKELE AARDAPPELRASSEN DOOR *COLLETOTRICHUM ATRAMENTARIUM*

With a summary: A disease, caused by Colletotrichum atramentarium, in tubers of certain potato varieties

DOOR

J. C. Mooi

Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (I.P.O.), Wageningen

INLEIDING

In het voorjaar 1952 werd een voordien onbekend ziekteverschijnsel bij aardappelknollen geconstateerd. Op de knollen kwamen oppervlakkige of enigszins ingezonken plekken afgestorven weefsel voor. In ernstige gevallen ging de kieming achteruit. De aantasting moest tijdens de bewaring zijn ontstaan of in ieder geval sterk uitgebreid, aangezien in de herfst niets bijzonders was opgemerkt, bij de in het volgend voorjaar sterk aangetaste partijen aardappelen.

Aangezien de knolaantasting veel nadeel veroorzaakte werd een onderzoek ingesteld naar de oorzaak en de bestrijding ervan. Dit onderzoek geschiedde, wat de bewaar- en ontsmettingsproeven betreft, in nauwe samenwerking met de Stichting voor Aardappelbewaring, zonder wier hulp het niet mogelijk geweest zou zijn deze uitvoerige en tijdrovende proeven te verrichten.[1])

Een korte mededeling van de resultaten werd reeds gepubliceerd (Mooi, 1955).

HET ZIEKTEBEELD

Het beeld van de aantasting is zeer verschillend. Men kan onderscheid maken tussen niet of nauwelijks ingezonken en dieper ingezonken plekken. In het eerste geval (sub a) is het weefsel van de aardappelknol tot hoogstens 1 mm diepte aangetast, in het laatste geval (sub b) kan de aantasting tot ± 1 cm diepte in de knol doordringen. Het pas aangetaste weefsel is bij de aantastingen (sub b) vaak diepzwart en vochtig, maar blijft stevig. Door het uitdrogen wordt het bruin. Meer oppervlakkige plekken zijn meestal meer of minder donkerbruin.

De plekken zijn zeer wisselend van grootte. Soms zijn ze zeer klein, soms uitgestrekt over een groot oppervlak van de knol. De omtrek is meestal zeer onregelmatig (fig. 1 en 2), soms echter afgerond. Typisch zijn ringvormige aantastingsbeelden (fig. 3). Deze treden dikwijls op aan de rand van de door de verwekker van zilverschurft, *Spondylocladium atrovirens* Harz, op aardappelknollen veroorzaakte ronde oppervlakkige vlekken.

[1]) Gaarne wil ik hierbij mijn dank betuigen voor de assistentie die eerst door Mej. E. Rauws en Mej. I. Kool en later door de heren G. H. Heitmeyer en J. Achterberg bij het werk verleend werd.

Ook de assistenten van de Stichting voor Aardappelbewaring, de heren E. Kroesbergen, T. Lefnstra en P. Oosterhof bedank ik voor hun hulp bij het verrichten van de uitvoerige bewaar- en ontsmettingsproeven.

Wanneer een groot aantal ingezonken plekken op een knol voorkomt of een enkele ingezonken plek zich sterk uitbreidt krijgt de knol een onooglijk uiterlijk (fig. 4). Komen de ingezonken plekken voor ter plaatse van een oog dan kiemt dit niet meer (fig. 5). Zijn alle ogen aangetast dan kiemt de knol dus in het geheel niet meer. Het komt ook voor dat de gehele oppervlakte van de knol aangetast is, perkamentachtig hard wordt en sterk rimpelt. Ook dgl. knollen kiemen niet meer (fig. 6).

VOORKOMEN

De aantasting is voornamelijk van belang bij het ras Saskia, hoewel ook bij enkele andere aardappelrassen, o.a. Voran en Sirtema dergelijke knolaantastingen wel kunnen voorkomen. Tot nu toe is de aantasting alleen op zandgrond geconstateerd.

De aantasting wordt bij het rooien niet waargenomen, maar treedt tijdens de bewaring op en neemt dan geleidelijk toe tot het eind van de bewaarperiode.

ONDERZOEK NAAR DE OORZAAK VAN DE KNOLAANTASTING

Het is uit het onderzoek gebleken dat *Colletotrichum atramentarium* (Berk. et Br.) Taubenh. de oorzaak van de aantasting is. Dit volgt met voldoende zekerheid uit hetgeen onder de volgende vier punten vermeld wordt:

1. Uit het aangetaste knolweefsel werd in de meeste gevallen *C. atramentarium* geïsoleerd. Deze schimmel groeit ook uit heel kleine stukjes aangetast weefsel.
2. Het microscopisch-anatomisch beeld van het mycelium in het aangetaste weefsel heeft overeenkomst met dat van een door *C. atramentarium* veroorzaakte en als zodanig reeds lang bekende vlekvormige knolaantasting, de zg. zwarte spikkel.
3. Bij inoculatieproeven met *C. atramentarium* op aardappelknollen van het ras Saskia werden aantastingsbeelden verkregen, geheel gelijkend op de hiervoor beschrevene.
4. Bij potproeven bleek dat op Saskia knollen, gegroeid in kunstmatig met *C. atramentarium* besmette grond, eveneens plekken ontstonden geheel gelijk aan hetgeen hiervoor beschreven is.

ad 1: C. atramentarium is een zeer algemeen op aardappelknollen voorkomende schimmel, die bij allerlei rassen de zg. zwarte spikkel veroorzaakt. Deze zeer oppervlakkige vlekvormige aantasting is te herkennen aan de kleine zwarte, met het blote oog nog juist zichtbare lichaampjes, de zg. sclerotiën, die op de vlekken voorkomen. Deze aantasting is zeer algemeen en komt ook op Saskiaknollen veel voor. Dat *C. atramentarium* geïsoleerd werd uit de hiervoor beschreven knolaantasting was dan ook nog in het geheel geen bewijs dat deze schimmel de oorzaak van de aantasting was.

ad 2: Op de grens van het nog levende en het aangetaste knolweefsel werden, behalve myceliumdraden ook typische pseudo-parenchymatische myceliumstructuren waargenomen. Deze zelfde myceliumstructuren werden ook in het aangetaste weefsel van zwarte spikkel-vlekken geconstateerd.

ad 3: De inoculatieproeven werden als volgt uitgevoerd: Knollen van het ras Saskia werden zeer oppervlakkig tangentiaal aangesneden. Op de wond werd wat mycelium of een sporensuspensie, afkomstig van een cultuur van *C. atramentarium* gekweekt op een kunstmatige voedingsbodem, gebracht. De knollen werden daarna in een vochtige omgeving geplaatst bij 15°C. Na enige tijd werden ze bij een andere temperatuur gebracht. Deze temperatuur was verschillend bij verschillende proeven en lag tussen 3½° en 32°C. Er werd gewerkt met verschillende isolaties van *C. atramentarium*. Deze proeven werden in verschillende jaargetijden verricht. Ondanks de vele proeven werden slechts in enkele gevallen aantastingsbeelden verkregen als hierboven beschreven.

Bij later genomen proeven werden de geïnoculeerde knollen na de inoculatie of direct, of na enige tijd aan het daglicht geplaatst, aangezien gebleken was dat bij knollen bewaard in glazen bewaarplaatsen meer aantasting optrad. In verschillende gevallen ontstonden nu zeer typische aantastingsbeelden (fig. 7), geheel overeenkomend met de hiervoor beschrevene. Het percentage goed gelukte inoculaties was echter niet groot; het was gemiddeld 13%. Uit de aangetaste plekken werd *C. atramentarium* gereïsoleerd.

Er werden voorts nog inoculatieproeven verricht op Saskiaknollen tijdens de groei in de grond, dus terwijl de knollen nog aan de plant vastzaten. Deze inoculaties hadden echter geen resultaat.

ad 4: Saskia planten werden gekweekt in potten met grond, welke eerst gesteriliseerd was en daarna kunstmatig besmet met *C. atramentarium*. Op de knollen geoogst van deze planten kwam zeer veel zwarte spikkel voor. Dit was op zichzelf niets bijzonders; maar verrassend was dat een gedeelte van deze vlekken na vrij korte tijd donkerder en min of meer, soms zeer sterk ingezonken werd, zodat geheel met de hiervoor beschreven ziektebeelden overeenkomende aantastingen ontstonden (fig. 8 en 9). De samenhang tussen deze zwarte spikkelvlekken en de juist genoemde knolaantastingen was onmiskenbaar. De contouren van de zwarte spikkel-vlekken en die van de knolaantastingen vielen dikwijls geheel samen. Bij de controle, waarbij ontsmette knollen werden geplant in gesteriliseerde grond, werden ook enkele knolaantastingen geconstateerd, maar in veel mindere mate. Vermoedelijk is de knolontsmetting niet volledig geweest, hoewel het plantmateriaal voor het oog vrij was van knolaantasting. Het is echter begrijpelijk dat het niet eenvoudig was om door ontsmetting de knollen vrij van *C. atramentarium* te krijgen, aangezien de schimmel in de knol voorkomt en niet alleen buiten op de knol.

Opvallend was dat bij de potproeven het percentage aangetaste knollen groot was en de knollen dikwijls in sterke mate waren aangetast.

Het is merkwaardig dat op aangetaste knollen, afkomstig uit de praktijk dikwijls weinig sclerotiën worden aangetroffen, terwijl het voorkomen van deze sclerotiën bij zwarte spikkel juist een typisch kenmerk is.

De onder punt 4 beschreven samenhang tussen zwarte spikkel en de hiervoorbeschreven knolaantasting werd in de praktijk niet geconstateerd. Meestal ontstond een knolaantasting zonder dat daaraan een zwarte spikkel-vlek voorafging.

Volledigheidshalve moet hier nog vermeld worden dat men aanvankelijk dacht dat de aantasting werd veroorzaakt doordat de knollen tijdens het verblijf in de grond aan te hoge temperaturen waren blootgesteld. In verband met

deze veronderstelling werden in 1952 en 1953 vele temperatuursmetingen van de grond, waarin de knollen groeiden, verricht. Deze metingen geschiedden vanaf eind juni tot het tijdstip dat de knollen werden gerooid. Er werd echter geen correlatie gevonden tussen het optreden van hoge temperaturen in de grond en het optreden van knolaantasting tijdens de bewaring daarna.

Bij de inoculatieproeven beschreven onder punt 4 was in sommige gevallen een rot ontstaan dat diep in de knol drong en deze ten slotte geheel deed wegrotten. Het aangetaste weefsel was zacht. Soms was het lichtbruin, soms echter weinig verkleurd en vrij droog. In het laatste geval kwamen holtes in het rotte weefsel voor, waarin de sclerotiën van *C. atramentarium* in groot aantal werden aangetroffen. Deze schimmel werd ook uit het rot geïsoleerd. In de literatuur worden enige gevallen genoemd, waarbij een zacht rot bij aardappelknollen door *C. atramentarium* werd veroorzaakt. Défago en Gasser (1949) beschrijven zulk een rot, evenals Wade (1949). Hun beschrijvingen komen vrij goed overeen. Het aangetaste weefsel was niet verkleurd en poederachtig. De aantasting bleef echter vrij oppervlakkig. Bij inoculatieproeven met *C. atramentarium* gelukte het aan de genoemde auteurs kunstmatig rot te veroorzaken. De temperatuur bij deze proeven was 26 °C. Bij de door mij verrichte inoculatieproeven, waarbij een zacht rot optrad, was de temperatuur eveneens hoog. Muller (1939) vermeldt ook knolrot bij aardappelen, veroorzaakt door *C. atramentarium*. Dit rot tastte de knollen in ernstige mate aan. Muller geeft echter geen duidelijke beschrijving van het rot en maakt ook geen melding van inoculatieproeven. Het blijft dan ook de vraag of *C. atramentarium* de oorzaak is van dit rot. Muller zegt dat hoge temperatuur en vochtigheid het rot bevorderen.

Men moet, gezien het voorgaande, echter wel met de mogelijkheid rekening houden dat *C. atramentarium* onder bepaalde omstandigheden (o.a. bij hoge temperatuur) in staat is een zacht rot bij aardappelknollen te veroorzaken.

Wenzl (1955) beschrijft in een recente publicatie vlekvormige beschadigingen bij aardappelknollen, waarbij het reserveweefsel van de knol tot op verschillende diepte is aangetast. Het beeld van deze beschadiging komt, afgaande op de door Wenzl gepubliceerde foto's sterk overeen met het beeld van de in het begin van dit artikel beschreven knolaantasting. In de meeste gevallen isoleert Wenzl *C. atramentarium* uit de beschadigingen. Niettemin is hij van mening dat de beschadigingen primair veroorzaakt zijn door lage temperaturen tijdens de strenge winter 1953/54 en dat *C. atramentarium* secundair is binnengedrongen in deze koudebeschadigingen. Bij de in dit artikel besproken proeven is koudebeschadiging echter uitgesloten. De aangetaste knollen die bij de potproeven werden verkregen, waren nooit bij een lagere temperatuur dan omstreeks 10 °C bewaard op het moment dat reeds vele duidelijke aantastingsbeelden waren ontstaan. De vraag mag gesteld worden of bij het ontstaan van de vlekvormige beschadigingen, die Wenzl beschrijft, *C. atramentarium* niet veel meer een primaire rol heeft gespeeld dan door deze auteur verondersteld wordt.

INVLOED VAN ROOIDATUM EN BEWARING

In 1952, 1953 en 1954 werden van een aantal velden, beteeld met Saskia, monsters aardappelen gerooid en bewaard. Het betrof elk jaar omstreeks 10 velden,

alle gelegen op zandgrond. Van alle velden werd een gedeelte vroeggerooid (=25 juli) en een gedeelte rijpgerooid (= 25 augustus). Zowel het vroeggerooide als het rijpgerooide gedeelte werd op twee wijzen bewaard, nl. gedeeltelijk in bakjes in een glazen bewaarplaats, waarbij de aardappelen dus aan het licht waren blootgesteld en gedeeltelijk in zakken in een schuur. In 1953 en 1954 werd nog extra gerooid op een datum tussen vroeg- en rijprooien in gelegen. De monsters van deze extra rooidatum werden op dezelfde wijze bewaard als die van de beide andere rooidata.

De monsters werden tijdens de bewaring regelmatig gecontroleerd en het aantal aangetaste knollen vastgesteld. Het volgende werd geconstateerd:

1. Gedurende de eerste maanden van de bewaring was geen knolaantasting te vinden. De eerste aangetaste knollen werden eind november aangetroffen. Het aantal hiervan nam daarna geleidelijk toe tot het eind van de bewaarperiode.

2. Bij vroegrooien was het percentage aangetaste knollen lager dan bij rijprooien. Dit gold voor alle onderzochte partijen en voor elk jaar van onderzoek. In een blokdiagram (fig. 10) zijn de gemiddelde percentages aangetaste knollen weergegeven van alle partijen, geoogst in 1952. Het blijkt dat zowel bij bewaring in de schuur als in de glazen bewaarplaats het gemiddelde percentage aangetaste knollen groter is wanneer rijpgerooid wordt. In het diagram geeft de verbreding van de kolom het percentage zwaar aangetaste knollen aan. Bij de bewaring in de glazen bewaarplaats is het gemiddelde percentage zwaar aangetaste knollen bij rijprooien viermaal zo groot als bij vroegrooien. In een tweede blokdiagram (fig. 11) zijn de resultaten vastgelegd van het onderzoek van de in 1953

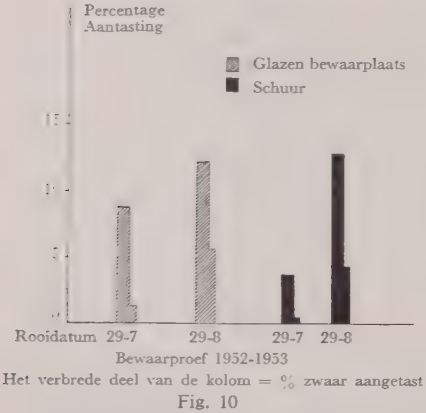


Fig. 10

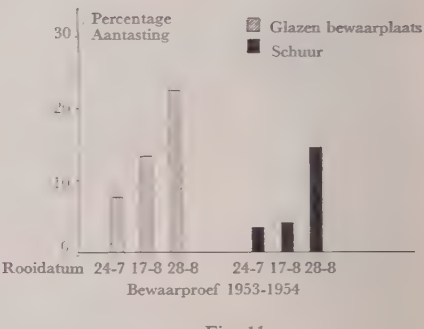


Fig. 11

FIG. 10. Diagram van de resultaten van de bewaarproeven in 1952–'53.

Diagram of the results of the storage experiments during 1952–'53.
In this diagram is shown the percentage of affected tubers after storage in a glass storehouse (hatched columns) and in a shed (black columns). The potatoes were lifted at two different dates, viz. 29–7 and 29–8.
The broadened columns indicate the percentage of severely affected tubers.

FIG. 11. Diagram van de resultaten van de bewaarproeven in 1953–'54.

Diagram of the results of the storage experiments during 1953-'54. For explanation see fig. 10. The potatoes were lifted at three different dates, viz. 24-7, 17-8 and 28-8.

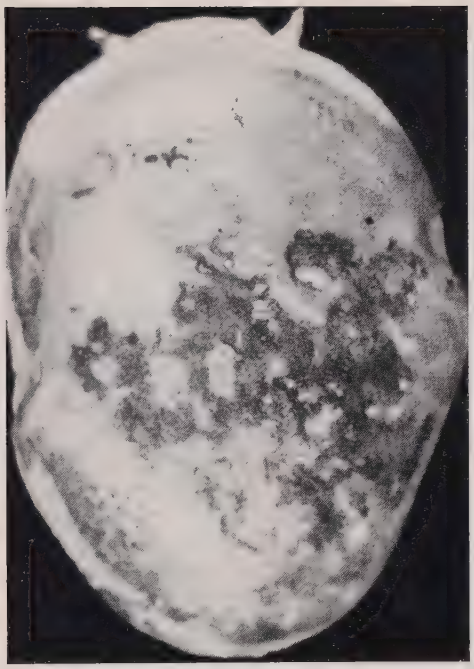


Fig. 1

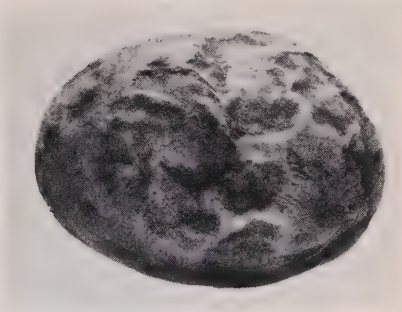


Fig. 2

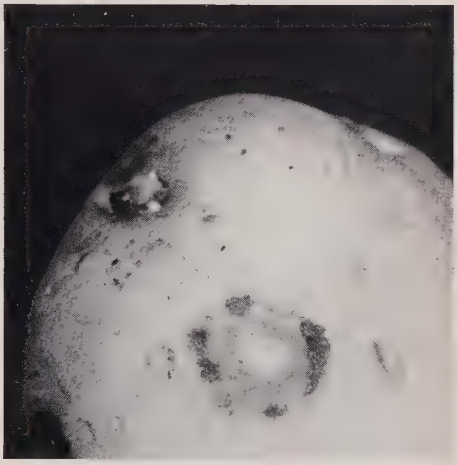


Fig. 3

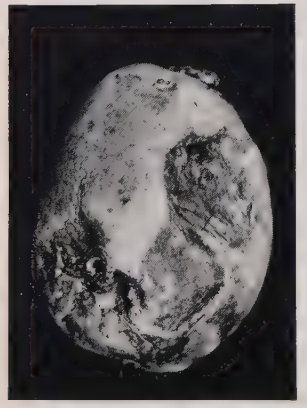


Fig. 4

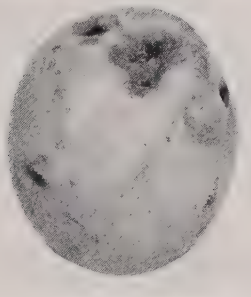


Fig. 5

Fig. 6

FIG. 1 T/M 6. Aardappelknollen, aangetast door *Colletotrichum atramentarium*. Ras Saskia (fig. 2. foto van de Plantenziektenk. Dienst).

Potato tubers, affected by Colletotrichum atramentarium. Variety Saskia.

FIG. 3. *A diseased patch in the shape of a ring.*
FIG. 4. *A deeply sunken diseased patch.*
FIG. 5. *A sunken patch at an eye (which does not sprout any more).*
FIG. 6. *The entire surface of the tuber is affected, the skin has become parchment-like in texture. The tuber does not sprout any more.*

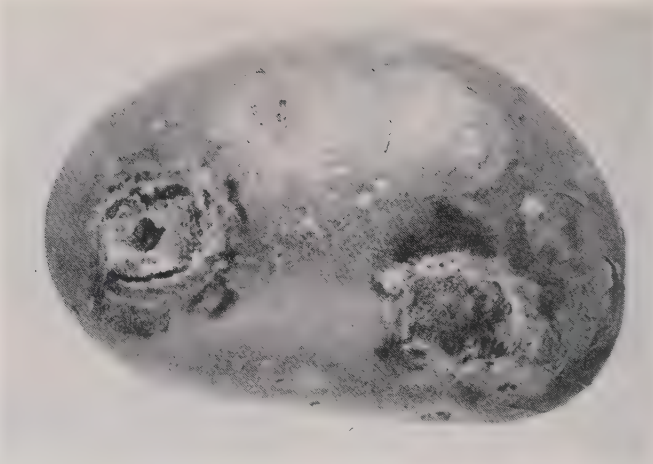


FIG. 7. Een knol, geïnoculeerd met *Colletotrichum atramentarium*. Er zijn ingezonken plekken ontstaan in de huid rondom de geïnoculeerde plek.
A tuber, inoculated with Colletotrichum atramentarium. The skin, surrounding the inoculated spot, is sunken.

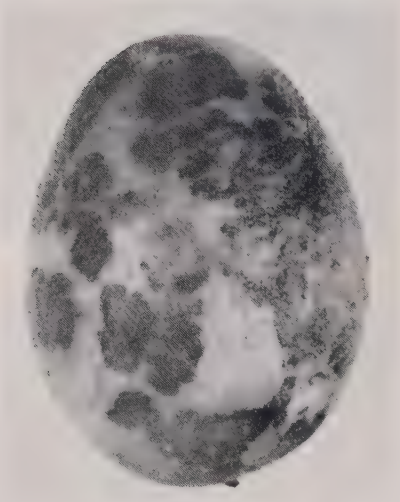


Fig. 8

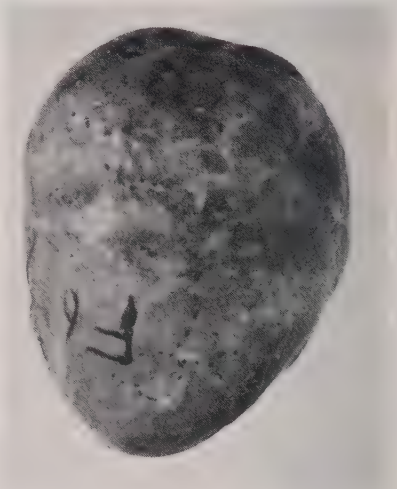


Fig. 9

FIG. 8. Een knol, gekweekt in kunstmatig geïnfecteerde grond en daarna enige tijd bewaard. De knol heeft iets ingezonken vlekken, veroorzaakt door *Colletotrichum atramentarium*.
A tuber grown in artificially inoculated soil and stored afterwards during some time. The tuber has slightly sunken patches, which are caused by Colletotrichum atramentarium.

FIG. 9. Idem fig. 8. De knol heeft echter diep ingezonken plekken.
The same as in fig. 8, but the patches are deeply sunken.

geoogste aardappelen. Het gemiddelde percentage aangetaste knollen van alle partijen is aangegeven. Ook uit dit diagram, waarin de uitkomsten van drie achtereenvolgende rooidata zijn aangegeven, blijkt dat er meer aantasting is naarmate later gerooid wordt. De resultaten, die verkregen zijn bij de in 1954 geoogste partijen, zijn gelijk aan die van 1953, met dit verschil dat bij de op de tweede rooidatum (medio augustus) geoogste aardappelen reeds een sterke knolaantasting voorkwam, zodat het gemiddelde percentage aangetaste knollen niet lager was dan bij de in eind augustus gerooide aardappelen.

3. Bij bewaring in de schuur was de aantasting minder sterk dan bij bewaring in de glazen bewaarplaats. Dit blijkt duidelijk uit de diagrammen van fig. 10 en fig. 11. Bij de rijpgerooide aardappelen, geoogst in 1952 is het percentage aantasting iets hoger bij bewaring in de schuur, maar het percentage zwaar aangetaste knollen is duidelijk lager. Met uitzondering van dit ene geval is de aantasting bij bewaring in de schuur steeds minder sterk dan bij bewaring in de glazen bewaarplaats. Bijzonder groot waren de verschillen bij de proef met in 1954 geoogste aardappelen. Het gemiddelde percentage aangetaste knollen was bij deze proef bij bewaring in de schuur 7,6% en bij bewaring in de glazen bewaarplaats 22,2%.

Men kan de grote verschillen in aantasting bij de twee bewaarmethoden niet verklaren door het verschil in temperatuur van de schuur en de glazen bewaarplaats aangezien dit verschil niet groot was. Bovendien werd bij een proef, waarbij monsters werden geplaatst bij verschillende temperaturen, niet gevonden dat de temperatuur een belangrijke rol speelt bij het optreden van knolaantasting. Vermoedelijk veroorzaakt ook het licht direct geen sterkere aantasting, maar wel indirect doordat de knollen groen worden. Het groen geworden knolweefsel wordt sterker aangetast dan het niet groene. Dit is gebleken bij de potproeven. Hierbij werden vaak knollen geoogst, die gedeeltelijk groen waren. Wanneer dgl. knollen aangetast waren door zwarte spikkel bevonden deze vlekken zich op het niet groene deel van de knol. Tijdens de bewaring van deze knollen in het donker ontstond echter het eerst aantasting waar een zwarte spikkel-vlek een groene plek raakte. Vervolgens breidde de aantasting zich speciaal over het groene deel van de knol uit.

KNOLONTSMETTING

De knolaantasting kon bestreden worden door ontsmetting met een pootaardappelontsmettingsmiddel. Deze middelen bevatten als actieve stof een organische kwikverbinding. De ontsmetting geschiedde vlg. het voorschrift voor ontsmetting tegen lakschurft. Hierbij worden de aardappelen 1 min. in een 0,5% oplossing van het middel ondergedompeld. De ontsmetting tegen de knolaantasting moet echter tijdig geschieden.

De resultaten van een ontsmettingsproef in 1953 zijn in een blokdiagram (fig. 12) samengevat. In dit diagram zijn de gemiddelde percentages aangetaste knollen aangegeven van een aantal ontsmette partijen, gerooid op twee data, resp. 17 augustus en 26 augustus. Ook het percentage aangetaste knollen van de niet ontsmette, maar alleen onder water gedompelde knollen van dezelfde partijen, is aangegeven. Uit het diagram blijkt, dat wanneer 17 september ontsmet werd, er belangrijk minder aantasting optrad. Indien 4 november ontsmet werd was de uitwerking vrij gering.

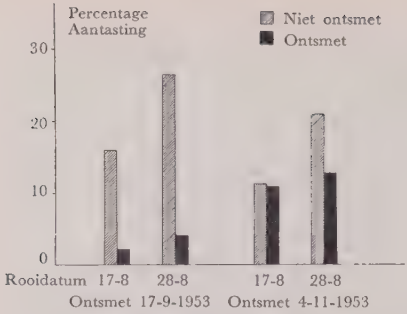


FIG. 12. Diagram van de ontsmettingsproeven

The diagram indicates the percentages of affected tubers in disinfected (black columns) and not disinfected lots (hatched columns) after storage in a glass storehouse. The potatoes were lifted at two different dates, viz. 17-8 and 28-8 as indicated in the figure. The two black columns on the left represent lots disinfected on 17-9-'53, and the two columns on the right lots disinfected on 4-11-'53.

De ontsmettingsproeven in 1954 hadden hetzelfde resultaat als die van 1953. Zie tabel I.

TABEL I. Ontsmettingsproeven in 1954
TABLE I. *Disinfection experiments in 1954*

Partij *Lot*	Percentage aangetaste knollen *Percentage of affected tubers*							
	Rooidatum 23-7-1954 *Lifting date 23-7-1954*				Rooidatum 26-8-1954 *Lifting date 26-8-1954*			
	Ontsmetting 28-9 *Disinfection 28-9*		Ontsmetting 22-11 *Disinfection 22-11*		Ontsmetting 28-9 *Disinfection 28-9*		Ontsmetting 22-11 *Disinfection 22-11*	
	Ontsmet *Disinfected*	Niet ontsmet *Not disinfected*	Ontsmet *Disinfected*	Niet ontsmet *Not disinfected*	Ontsmet *Disinfected*	Niet ontsmet *Not disinfected*	Ontsmet *Disinfected*	Niet ontsmet *Not disinfected*
1	–	–	–	–	–	–	18,9	66,7
2	0	1,8	0,8	8,6	1,9	25,9	22,8	49,6
3	0	0,7	–	–	0,0	25,9	25,5	60,2
4	0	1,5	–	–	1,9	25,4	–	–
5	–	–	–	–	0	0	0,8	2,3
6	0	0	0	11,8	0	3,2	0,9	0
7	0	6,3	12,0	8,3	0,9	23,3	–	–
8	0	9,6	3,4	8,3	0	25,2	20,0	64,8
9	0,8	22,8	1,9	13,0	1,9	47,8	54,3	84,2
10	0	0	–	–	0	0	–	–
11	0	4,2	–	–	0	25,0	–	–
12	0	8,3	–	–	–	–	–	–
Gemiddeld % *Mean %*	0,1	5,5	3,6	10,0	0,7	20,2	20,4	46,8

Uit de tabel blijkt het goede effect van een tijdige ontsmetting. Indien de ontsmetting in september geschiedde trad zeer weinig aantasting op. Bij de vroeggerooide partijen werd zelfs bij geen enkele partij (uitgezonderd partij 9) aantasting gevonden. Werd daarentegen in november ontsmet, dan ontstond veel knolaantasting.

INVLOED VAN DE GROND OF VAN CULTUURMAATREGELEN

Dikwijls worden Saskia-aardappelen, geteeld op lichtere zandgrond, sterker aangetast, dan wanneer ze van minder lichte zandgrond afkomstig zijn. Dit gaat echter niet steeds op.

De stikstofbemesting en de pootdiepte hebben ook invloed op het optreden van de aantasting. Op proefvelden werd in drie achtereenvolgende jaren steeds geconstateerd, dat indien te weinig stikstof werd gegeven of ondiep werd gepoot de knolaantasting sterker was. Toch kan men het optreden van de knolaantasting in de praktijk niet verklaren door dit terug te voeren op het geven van weinig stikstof of het ondiep poten. Meestal wordt door de praktijk voldoende stikstof gegeven en ondiep poten wordt niet vaak toegepast.

INVLOED OP OPKOMST EN OPBRENGST; OVERGANG OP DE NATEELT

Wanneer partijen werden uitgeplant die sterk waren aangetast was de opkomst belangrijk slechter, vergeleken met de opkomst van niet aangetaste partijen. De verschillen in opbrengst verkregen van partijen sterk aangetaste of van niet aangetaste pootaardappelen waren echter minder groot.

Wanneer uiterlijk niet waarneembaar aangetaste en tevens ontsmette poters werden uitgeplant werd in de nateelt niet minder knolaantasting aangetroffen dan in de nateelt van aangetaste poters. Vermoedelijk worden de knollen dus aangetast door in de grond aanwezige *C. atramentarium*, ofschoon gebleken is dat de ziekte ook overgebracht wordt door de poter. Bij de in dit artikel beschreven potproeven met aardappelplanten, gekweekt in gesteriliseerde grond, werden ook niet ontsmette knollen geplant. In de nateelt van deze knollen kwam knolaantasting voor. In sommige gevallen was dit in sterke mate het geval.

GEMEINHARDT (1955) beschrijft proeven waarbij hij tracht *C. atramentarium* uit de grond te isoleren. Aangezien hij niet in staat is deze schimmel uit natuurlijke grond op een kunstmatige voedingsbodem te kweken concludeert GEMEINHARDT dat het zeer onwaarschijnlijk is dat *C. atramentarium* in de bodem voorkomt. Het resultaat van de hiervoor juist beschreven veldproef met ontsmette en niet ontsmette poters wijst er echter op dat de grond wel een besmettingsbron is. Dit blijkt ook nog uit de volgende proef. Aardappelplanten werden gekweekt in grond waarop het vorige jaar eveneens aardappelen waren gegroeid. Bij het object A was deze grond niet gesteriliseerd, bij het object B was dit wel het geval. In de knollen afkomstig van het object B kwam knolaantasting voor, maar in de knollen van object A was dit in veel sterkere mate het geval.

BESTRIJDINGSMAATREGELEN

De beste bestrijding van de knolaantasting is vroeg rooien en tevens ontsmetten, waarbij het ontsmetten tijdig dient te geschieden (vóór 1 oktober). Bij vroeg rooien treedt minder knolaantasting op, maar men heeft geen zekerheid dat er geen partijen zullen zijn, waarin een sterke aantasting voorkomt, al zal het aantal sterk aangetaste partijen minder zijn dan bij rijp rooien.

Ondiep poten moet vermeden worden.

DISCUSSIE

Uit hetgeen bij de bewaar- en ontsmettingsproeven werd geconstateerd wordt waarschijnlijk dat *C. atramentarium* bij vroegrooien nog maar weinig of niet in de knol is doorgedrongen. Bij rijprooien is de schimmel blijkbaar in sterkere mate naar binnen gedrongen, maar bevindt zich toch nog steeds in de buitenste lagen van de knol. Men neemt dan nog geen symptomen van aantasting waar. Het is nu nog goed mogelijk het mycelium door een ontsmettingsmiddel te doden. Na enige maanden is het mycelium dieper binnengedrongen en is een ontsmetting niet effectief meer. Nogmaals enige tijd later worden de eerste symptomen van de aantasting zichtbaar (eind november, begin december). Het verloop van de aantasting gaat dus blijkbaar zeer langzaam en dit verklaart ook ten dele waarom het zo moeilijk is om door inoculaties op de knol aantasting teweeg te brengen.

C. atramentarium is, zoals reeds werd medegedeeld, een zeer algemeen voorkomende schimmel. Het zal niet gemakkelijk zijn partijen aardappelen te vinden die er geheel vrij van zijn.

We moeten dan ook aannemen dat indien aardappelknollen worden aangetast op een wijze, zoals in dit artikel is beschreven, dit niet een kwestie is van al of niet aanwezig zijn van de schimmel. Deze komt algemeen voor. Het is vermoedelijk een kwestie van vatbaarheid. Deze vatbaarheid kan blijkbaar voorkomen bij bepaalde rassen gegroeid op bepaalde grondsoorten.

SUMMARY

In the spring of 1952 a disease was observed, affecting the tubers of potatoes, which up till then, had been unknown. Superficial patches of necrotic tissue appeared on the tubers and in many cases sprouting was adversely affected. The disease occurred in several varieties of potatoes, for instance in Saskia, Voran and Sirtema, but was chiefly of importance in the variety Saskia. The disease has only been observed in potatoes grown on sandy soil. Saskia, grown on heavier soil was not affected.

The diseased patches may be only slightly depressed. In that case the tissue of the tuber is not attacked to a depth of more than 1 mm. It is however possible that the tissue is attacked down to a depth of 1 cm. The affected tissue dries up and sunken patches thus appear. The lesions are mostly irregular in outline. If the affected tissue occurs at the eyes they will not sprout (figs. 1–6).

The disease occurs during storage. The first distinct symptoms were observed in the end of November. Thereafter the number of the diseased patches and the severity of the disease gradually increased.

In the majority of cases *Colletotrichum atramentarium* (Berk. et Br.) Taubenh. was isolated from the affected tissue. Many inoculations with this fungus were carried out on potato tubers, but rarely a convincing result was obtained from any of these experiments. When, however, the tubers were inoculated and subsequently kept in daylight the very characteristic symptoms of the disease, described in this article, did appear (fig. 7). Other tests were carried out in which potato plants were grown in pots containing sterilized soil, which had been artificially inoculated with *C. atramentarium*. When the tubers were lifted and stored for some months, most of them showed the symptoms of the disease (figs. 8 and 9). In the control tests potato plants were grown in sterilized soil. Most

of the tubers obtained from these tests remained free from the disease. Not all tubers from the control tests were free from the disease. This must be explained by the fact that the disinfection of the seed tubers, used in the pot-experiments, was not complete.

The results of these investigations constitute sufficient evidence to establish *C. atramentarium* as the cause of the disease.

WENZL (1955) described a superficial affection of potato tubers which resembles the disease, dealt with in this article. He also isolated *C. atramentarium* but he arrived at the conclusion that low temperature is the cause of the affection.

If the tubers are lifted early the percentage of diseased tubers is less than if the tubers are lifted ripe (fig. 10 and 11). The affection is also less severe when the tubers are stored in darkness than when they are stored in the glass storehouse (figs. 10 and 11). The disease can be controlled by treating the potatoes with a seed potato disinfectant based on an organic mercury-compound (fig. 12 and Table 1). The disinfection should be carried out before 1st of October.

No difference in degree of attack was found between the crop raised from severely affected seed tubers and the crop obtained from disinfected seed tubers which were apparently healthy.

The best way of controlling the disease is to lift the potatoes early and to disinfect them in good time.

C. atramentarium is a fungus which occurs on potato plants in many parts of Europe, in the United States and Canada, South Africa, Brazil, Australia etc. It will be probably difficult to find fields of potato plants in which the fungus does not occur. If potato tubers are affected by the disease described in this article this is not a question of occurrence of the fungus but presumably a question of susceptibility of the tubers.

POSTSCRIPT BY THE AUTHOR

After the above article was written I read a publication by BRAUN (H. BRAUN, 1955. Die Schalennekrose der Kartoffelknolle. Kartoffelbau 6:263–265), describing a disease of potato tubers, which strikingly resembles the tuber condition investigated. BRAUN states that he often isolates *C. atramentarium* from the diseased tuber tissue, but that inoculations with this fungus do not result in infection. This leads to the conclusion that *C. atramentarium* is not the cause of the tuber disease. It is suggested, that poisonous fumes are a factor in the origination of the disease.

In my experiments I have proved that *C. atramentarium* is the cause of the tuber infection of Saskia, described in the above article. Poisonous fumes cannot have been a factor in the origination and development of the disease of these tubers, because the tubers were stored in very small quantities in open baskets in a well ventilated room. It is highly improbable that under these storage conditions poisonous fumes could have existed in a concentration noxious to the tubers.

The conclusion of BRAUN that *C. atramentarium* is not the cause of the tuber disease because his inoculation experiments did not give positive results, seems premature. My experiments described above with Saskia tubers show that it is very difficult to obtain the typical symptoms of the disease by inoculating the tubers with *C. atramentarium*. I am inclined to assume that the tuber disease which BRAUN describes is caused by this fungus because it strongly resembles the tuber infection of Saskia.

I have already mentioned in the above article that in my opinion the disease described by WENZL (1955) is probably also caused by *C. atramentarium*. It seems that *C. atramentarium* is the cause of a tuber disease which frequently occurs in Germany and which is also found in Austria and the Netherlands in several varieties.

Défago, G. & R. Gasser, – 1949. La dartrose de la pomme de terre. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 53 A: 480–497.

Gemeinhardt, H., – 1955. Zur Frage des Saprophytismus von Colletotrichum atramentarium (B. et Br.) Taub. Nachr.blatt f. d. Deutsch. Pflanzenschutzd. 9: 128–133.

Mooi, J. C., – 1955. Knolaantasting bij enige aardappelrassen door Colletotrichum atramentarium (Berk. et Br.) Taub. T. Pl.-ziekten 61: 22–23.

Muller, H. R. A., – 1939. Onderzoekingen over aardappelziekten. Meded. Alg. Proefst. Landb., no. 33: 1–17.

Wade, C. C., – 1949. An unusual potato rot (Colletotrichum atramentarium). Journ. Austr. Inst. Agric. Sci. 15: 42.

Wenzl, H., – 1955. Kälteschäden und Schwarzpunkt-Fleckenkrankheit (Colletotrichum atramentarium) der Kartoffelknollen. Pflanzenschutz Ber. 14: 1–20.

T. Pl.ziekten 62 (1956): 285–290

VERSCHIL IN REACTIE VAN WILDE SLA TEN OPZICHTE VAN BESMETTING MET HET SLAMOZAIEKVIRUS

With a summary:
Differences in reaction of wild lettuces with regard to infection by Lactuca virus 1

DOOR

Ir. H. A. VAN HOOF

Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek te Wageningen; gedetacheerd bij het Proefstation voor de Groenteteelt in de volle grond te Alkmaar

INLEIDING

De schade, die het mozaïekvirus, (*Lactuca virus 1*), in sla veroorzaakt is moeilijk te voorkomen. Resistentie van het gewas tegen deze ziekte zou de beste oplossing zijn. In de gekweekte sla komt echter geen resistentie voor. Van de beweerde resistentie van het Amerikaanse bindsla-ras Parris Island (BOHN, 1953) bleek niets in onze proeven. Hoogstens reageert dit ras iets minder hevig dan de meeste slarassen. Wij hebben daarom getracht bij wilde slarassen resistentiefactoren te vinden.

HET GEBRUIKTE MATERIAAL

Van een aantal botanische tuinen werd zaad voor het onderzoek ontvangen. Bovendien werd in Nederland zaad verzameld van *Lactuca serriola* L. Wij hebben speciaal aan deze slasoort aandacht besteed, omdat geconstateerd was, dat bij *L. serriola* het virus niet met het zaad overgaat (WELCH et al, 1953). Bovendien staat deze soort genetisch dicht bij de gekweekte sla (*L. sativa*) en is er gemakkelijker mee te kruisen.

L. serriola wordt vooral gevonden in het gebied van de grote rivieren en op kalkrijke grond. Het is een plant, die vaak wordt aangetroffen op de resten van in de oorlog verwoeste huizen. Vaak bleek het uitgebloeide hoofdje echter geen zaad, doch een vliegelarve te bevatten (volgens Dr. W. J. KABOS waarschijnlijk *Paregle radicum* L.). Op iedere vindplaats werd van een zo groot mogelijk aantal planten wat zaad verzameld.

Verder werden ook van *L. virosa* L. verscheidene herkomsten op hun reactie ten opzichte van het virus getoetst.

PROEFOPZET

Zaad van de verschillende nummers werd in kistjes uitgezaaid en verspeend in perspotjes. Wegens de zeer slechte structuur van het proefveld, was direct planten onmogelijk. Het proefveld werd begrensd door een rij planten van het slaras Attractie en door twee rijen planten van dit ras, verdeeld in drie gelijke vakken. De Attractie werd voor het uitplanten van de nummers met behulp van caborundum geïnoculeerd met sap van mozaïekzieke slaplanten, waaraan een kleine hoeveelheid 0,1 M Na_2HPO_4-oplossing was toegevoegd.

Van ieder nummer werd in ieder vak een rij van 20 planten uitgezet, dus in

totaal 60 planten. De plantafstand bedroeg 30 cm in en 40 cm tussen de rijen. Geplant werd begin juni; op 29 juli werden de eerste waarnemingen over het optreden van de ziekte verricht.

De te toetsen nummers werden van de geïnoculeerde Attractie uit door de in het veld aanwezige luizen besmet.

RESULTATEN

Wat de botanische soorten betreft, kunnen wij kort zijn. Alle bleken vatbaar voor het virus te zijn. Bij het ene ras, waarvan geen plant ziek werd, moest dit achteraf geweten worden aan ontsnapping aan de infectie. Kort na het uitplanten vormden deze planten hun bloeistengel en rijpte het zaad, als gevolg waarvan de symptomen niet meer waren waar te nemen. Bij het opnieuw toetsen van dit ras bleek het nl. wel vatbaar te zijn. Een opsomming van de namen van deze rassen heeft weinig betekenis, omdat de namen slechts ten dele juist bleken. Dit konden wij vaststellen bij de nummers, die wij onder de naam *L. virosa* L. en *L. serriola* L. (*L. scariola* is een synoniem, CHEVALIER, 1943) ontvingen. De naam van verscheidene inzendingen bleek hier niet met de werkelijkheid overeen te komen. Wij bepalen ons daarom tot vermelding van de resultaten bij *L. virosa* en *L. serriola*.

Van beide soorten werden vele herkomsten op hun reactie ten opzichte van het slamozaïekvirus getoetst. *L. virosa* reageert op besmetting met *Lactuca virus 1* met een plaatselijke necrose, die zich voortplant tot de hartbladeren, waardoor de hele plant afsterft. Bij *alle* herkomsten was deze reactie volkomen identiek. De vierde maal, dat de mate van aantasting werd opgenomen, nl. op 9 september 1955, hebben wij echter niet het aantal planten met ziektesymptomen geteld, doch het aantal uiterlijk nog gezonde planten en het aantal afstervende planten. De gegevens zijn in Tabel 1 samengevat.

TABEL 1. Het verloop van de infectie met *Lactuca virus 1* bij *Lactuca virosa* L.
Table 1. Course of infection with Lactuca virus 1 in Lactuca virosa L.

Herkomst *Origin*	Aantal zieke planten op: *Number of diseased plants on:*			Aantal gezonde planten op: *Number of healthy plants on:*	Aantal afstervende planten op: *Number of dying plants on:*
	29/7	8/8	19/8	9/9	9/9
Bern	5	19	46	2	19
Poznan	7	21	46	0	13
Coimbra (Portugal)	1	13	31	0	9
Keulen	1	6	14	11	40
Stockholm	7	21	50	2	11
Sacavém (Portugal)	1	13	36	0	5

Alleen *L. virosa* afkomstig uit Keulen bleek belangrijk minder vatbaar voor het virus te zijn.

In onze proef met herkomsten van *L. serriola* werden negen buitenlandse en zevenentwintig zelf verzamelde nummers opgenomen. Hierbij dient te worden opgemerkt, dat de buitenlandse nummers zowel onder de naam *L. serriola* L. als onder de naam *L. scariola* L. werden ontvangen (vandaar de twee nummers uit Coimbra).

Fig. 1.

Een plant van *Lactuca serriola*, afkomstig van Maurik, die met necrose reageerde. Bij verdere doorgroei veranderde het ziektebeeld echter in een mozaïek, gepaard met kleine, necrotische vlekjes

A plant of Lactuca serriola from Maurik reacting to infection by Lactuca virus 1 with necrotic leaves. Further growth showed mosaic and little necrosis

Fig. 2.

Heldere, doorzichtige plekjes langs de bladnerf bij *Lactuca serriola*, afkomstig uit Coimbra

Glassy translucent spots along the veins of the leaf of Lactuca serriola originating from Coimbra

Het zaad, dat uit Besançon in 1953 ontvangen werd, is in 1954 door ons in de kas vermeerderd en beide werden in onze proef van 1955 opgenomen. Zoals uit de tabel blijkt, was hun reactie ook gelijk. De eerste drie keren, dat waarnemingen werden verricht, telden wij het aantal zieke planten en maakten een onderscheid naar de optredende symptomen, nl. „veinclearing" en mozaïek weergegeven door M.; trad bovendien necrose op, dan werd dit gemerkt met M.N. en indien het ziektebeeld uitsluitend uit een afsterving van het blad bestond met N. *L. serriola* (ontvangen als *L. scariola*) uit Coimbra reageerde op het mozaïek met rode vlekjes en ook wel met lichte, glazige plekjes langs de hoofdnerf. Naderhand verdwenen deze en ontstond een zwak mozaïek.

In september 1955 werd het opvallende verschil in reactie van de plant op het virus, dat tot uiting kwam in de doorgroei van de plant, in een cijfer weergegeven. Indien de plant, ondanks de ziektesymptomen normaal doorgroeide, werd een cijfer 3, voor minder goede groei een cijfer 2, voor slechte groei een cijfer 1 gegeven. Was de plant afgestorven of na de infectie nagenoeg niet meer gegroeid, dan kreeg hij het cijfer 0. Maximaal kon dus per herkomst $60 \times 3 = 180$ worden bereikt. Deze toekenning van een standcijfer vereenvoudigde de indeling en beoordeling. De gegevens zijn te vinden in Tabel 2.

De gegevens in Tabel 2 zijn gerangschikt naar een drietal reactie-typen, die in grote lijnen als volgt onderscheiden kunnen worden.

a. Bij de meeste rassen komt voor een lichter worden der nerven („veinclearing"), gevolgd door mozaïekverschijnselen, terwijl soms later necrose optreedt. Dit optreden van necrotische symptomen is bij enkele nummers echter vrij opvallend, b.v. bij de herkomsten 's-Hertogenbosch, Arnhem, Blerick, Gulpen en Braunschweig.

b. Het eerste symptoom bestaat vnl. uit necrose, die zich soms over de gehele plant uitbreidt (Velp). Ook kan de plant na aanvankelijke necrose met mozaïeksymptomen doorgroeien, zoals bij de herkomsten Voorst en Maurik (Fig. 1). De herkomsten Lent en Stockholm staan tussen deze beide groepen in.

c. Een herkomst van wilde sla uit Coimbra reageerde niet met veinclearing, maar met heldere of rode plekjes langs de bladnerf (weergegeven met S in Tabel 2; zie Fig. 2), die later verdwenen, terwijl het beeld overging in een zwak mozaïek.

Opvallend is, dat vooral de Nederlandse herkomsten in hun groei vaak zo sterk op het virus reageerden, terwijl de buitenlandse nummers meestal normaal doorgroeiden.

Nooit werden in het veld verschijnselen van virusziekte bij *L. serriola* waargenomen en uit het voorkomen van een stam, die met totale afsterving reageert (Velp) lijkt de conclusie gerechtvaardigd, dat het virus in Nederland in de natuur niet bij wilde sla voorkomt.

Indien wij de gevonden standcijfers in kaart brengen, blijkt ook, dat er enige regelmaat in te bespeuren valt. (Fig. 3). De herkomsten, die vnl. met necrose reageren waren afkomstig uit een gebied ten noorden van de Waal. De heftige groeiremming (uitgezonderd de herkomst Velp, waarbij de reactie tevens necrose was) kwam in het materiaal, verzameld bij Venlo en zuidelijker langs de Maas voor. Dat dit echter geen algemene regel is, blijkt uit de hoge standcijfers voor de herkomsten uit Tegelen en Bunde.

TABEL 2. Het verloop van de infectie met *Lactuca virus 1* bij *Lactuca serriola* L.
Table 2. Course of infection with Lactuca virus 1 in Lactuca serriola L.

Herkomst *Origin*	Aantal zieke planten op: *Number of diseased plants on:*									Standcijfers op: *General growth index on:*
	29/7			8/8			19/8			9/9
	M[1])	MN[2])	N[3])	M[1])	MN[2])	N[3])	M[1])	MN[2])	N[3])	
a. Venlo-stad . . .	9			46			60			11
Venlo-proeft. . .	16			50		1	56	4		12
Maaseyk	14			52			59		1	16
Stein	17			48			59			21
Amby	16			47			60			32
Grevenbicht . . .	8			53			60			32
Vaals	12			48		2	59	1		40
Blerick	15		2	41	4	7	49	11		58
Geleen	9			36			57		2	75
Aken	6		1	44	1	1	59		1	81
Gulpen	10			36	2		38	22		85
Vaals-Aken . . .	17	1		47			57	2		91
Oosterbeek . . .	12			33	5		55	5		107
Aken, 3 km ten Z. v.	30			57			56	4		112
Arnhem	17			42		6	49	11		115
's-Hertogenbosch	22	1		38	18		48	11	1	118
Tegelen	6		2	48		2	57	2		121
's-Graveland . .	15		1	31			53			126
Bunde	17			46			56	1		128
Zinselbeek. . . .	8			43		2	59	1		130
Zetten	19			48			60			132
Besançon '53. . .	20			56		1	55	5		133
Besançon, uit kas	16			56			57	3		134
Grebbeberg . . .	28			52			60			147
Braunschweig . .	27		4	46	7		36	22		151
Kerkdriel	28			49			58		2	164
Rome.	15			55			60			180
Lissabon	15			54			59			180
Sacavém	18		1	57			59		1	180
Coimbra	18			56			58		1	180
b. Voorst	3		21	1		49		60		117
Maurik	3		17	3		47	2	57		120
Lent	11		6	33	3	2	22	38		125
Stockholm . . .	18		12	31	23		15	43		177
Velp	15		16	4		54	5		55	0
c. Coimbra	1		11 s[4])	19		5 s[4])	55	5		180

[1]) M = mozaïek als gevolg van infectie met *Lactuca virus 1.*
M = *mosaic as a result of infection with Lactuca virus 1.*

[2]) MN = mozaïek en necrose als gevolg van infectie met *Lactuca virus 1.*
MN = *mosaic and necrosis as a result of infection with Lactuca virus 1.*

[3]) N = necrose als gevolg van infectie met *Lactuca virus 1.*
N = *necrosis as a result of infection with Lactuca virus 1.*

[4]) S = roodachtige of doorschijnende vlekjes langs de nerven als gevolg van infectie met *Lactuca virus 1.*
S = *reddish or glassy translucent spots along the veins as a result of infection with Lactuca virus 1.*

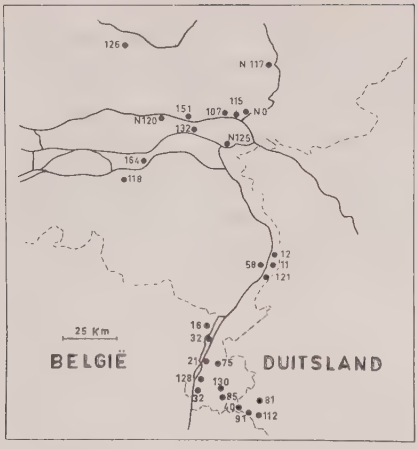


Fig. 3. Kaart, waarop bij de vindplaatsen van *Lactuca serriola* het gegeven standcijfer is vermeld.

Map showing the places where samples of Lactuca serriola were collected. The figures indicate the growth index of each sample after infection with Lactuca virus 1

SAMENVATTING

Hoewel wij in onze opzet nl. het vinden van resistente *Lactuca serriola* L. niet slaagden, vonden wij zeer grote verschillen in gevoeligheid voor het *Lactuca virus 1* tussen de verschillende herkomsten.

De herkomsten reageerden ieder voor zich zeer uniform op het virus. Uit de vaak zeer hevige reactie en het ontbreken van symptomen op de planten onder natuurlijke condities, concluderen wij, dat het virus in Nederland niet op planten van wilde sla voorkomt.

SUMMARY

Several botanical *Lactuca* spp. were tested for their susceptibility to *Lactuca virus 1*. All appeared to be susceptible. As the exact identifications are not certain, specific names are only mentioned of *L. virosa* L. and *L. serriola* L. Of these we tested plants of respectively six and thirty-five different places of origin.

The reaction of *L. virosa* to lettuce mosaic was in all cases a necrosis. The seed originating from Cologne was distinctly less susceptible (see Table 1). The reaction of *L. serriola* to lettuce mosaic was not the same for the different sources of this species. The most common symptom (see Table 2) was a veinclearing followed by mosaic and sometimes necrosis at the end of the growth period. ('s-Hertogenbosch, Arnhem, Blerick, Gulpen and Braunschweig). There were also plants from certain sources which first reacted with symptoms of necrosis (see Table 2). This was a total necrosis (Velp) and there were sources from which the plants grew on with mosaic symptoms and necrotic symptoms (Maurik and Voorst, Fig. 1). The plants from Stockholm and Lent were intermediate between the latter type and the former. *L. serriola* from Coimbra, received under the name of *L. scariola*, reacted with reddish necrotic or glassy translucent spots along the veins (Fig. 2). This symptom disappeared afterwards and changed into faint mosaic symptoms.

In September, there were great differences in height of growth between the

sources. Therefore, we gave all plants a rating indicating their growth. The rating 0 was given for total necrosis or total stop of growth after infection and the rating 3 for normal growth, whereas ratings 1 and 2 indicated reactions in increasing severity between 0 and 3. When the growth of all 60 plants of one source was normal after infection a total of $60 \times 3 = 180$ was given.

In Fig. 3 the resulting data were mapped. North of the river Waal strains of *L. serriola* reacting with necrosis occur. Near Venlo and south of this town strains of *L. serriola* were collected which showed the mosaic symptoms accompanied by bad growth, though some strains of plants were found which hardly showed a reduction of growth after infection with the virus.

LITERATUUR

Bohn, G. W. – 1953. The important diseases of lettuce. The Yearbook of Agriculture: 417–425.

Chevalier, A. – 1943. Laitues, chicorées et pissenlits, l'origine des formes cultivées. Rev. Bot. appl. Agric. trop. 23: 273–281.

Welch, J. E., Grogan, R. G., Zink, Z. W. & Zahara, M. – 1953. Better lettuce project makes gains. Western Grower and Shipper 24: 80–86.

T. Pl.ziekten 62 (1956): 291–304

HET MOZAIEK I EN DE HEKSENBEZEMZIEKTE VAN DE AARDNOOT (*ARACHIS HYPOGAEA* L.) IN WEST-JAVA EN HUN VECTOR, DE JASSIDE *OROSIUS ARGENTATUS* (EVANS)

With a summary:
Mosaic I and witches' broom disease of the groundnut (Arachis hypogaea) in West-Java and their vector, Orosius argentatus

DOOR

Dr. B. H. H. BERGMAN

(voorheen: Afd. voor Entomologie, Fac. van Landbouwwetenschap van de Universiteit van Indonesië, Bogor (Buitenzorg), Indonesië)

INLEIDING

In 1913 beschreef RUTGERS de symptomen van een tot op dat tijdstip onbekende ziekte van de aardnoot, die hij vond in een proefveld in Oost-Java en die hij de naam „krulziekte" gaf. Hij meende namelijk, dat de verschijnselen dezelfde waren als die van een in 1907 door ZIMMERMANN in Oost-Afrika onder de naam „Kräuselkrankheit" beschreven ziekte van *Arachis*, welke ziekte in 1925 door STOREY & BOTTOMLEY opnieuw beschreven werd onder de naam „rosette disease". De foto's, door RUTGERS in zijn artikel van 1913 gepubliceerd, doen echter meer denken aan de symptomen van een andere ziekte, die later door THUNG „heksenbezem" werd genoemd.

De ziekte bleek zich snel te verspreiden, zodat zij reeds enkele jaren later (RUTGERS, 1915) op verscheidene plaatsen in Oost-Java en ook op het eiland Madoera werd aangetroffen, zowel op *Arachis* als op enkele andere plantensoorten (o.a. *Crotalaria* en *Canavallia*).

SCHWARZ vond in 1927 hetzelfde ziektebeeld in de omgeving van Buitenzorg op *Arachis* en enkele soorten groenbemesters. Ook zij beschouwde de ziekte als identiek met de rosette disease van STOREY & BOTTOMLEY. Deze onderzoekers betwijfelden echter in een later artikel (1928) de juistheid van deze veronderstelling.

In 1947 publiceerde THUNG de resultaten van zijn onderzoek. Hij meende naast de door RUTGERS en SCHWARZ beschreven „heksenbezem" een drietal typen „mozaïek" van de aardnoot te kunnen onderscheiden. Van alle vier ziekten gaf hij uitvoerige beschrijvingen. Hij bewees, dat zij overgebracht kunnen worden door enting, maar niet met het perssap van zieke op gezonde planten en onderkende als eerste het virus-karakter van de verwekkers. Het leek hem onwaarschijnlijk, dat de heksenbezem van Java identiek is met de Afrikaanse rosette disease, maar hij merkte op, dat de symptomen van het Javaanse mozaïek I soms enigszins doen denken aan die van de „chlorotic rosette", een van de typen, die men in Afrika kan onderscheiden.

THUNG deed een oriënterend onderzoek naar de identiteit van de vectoren van deze ziekten, waarbij hij de volgende insecten gebruikte: *Empoasca* spec., *Bemisia gossypiperda* M. & L., *Thrips* spec. en *Aphis* spec. Heksenbezem kon door geen van deze insecten worden overgebracht, doch THUNG meende aan-

wijzingen te vinden, dat de bladluis fungeerde als een vector van de mozaïekziekten. De symptomen, welke door middel van dit insect op proefplanten werden veroorzaakt, waren echter weinig duidelijk en THUNG schreef, dat de proeven op onvoldoend grote schaal waren uitgevoerd om verdere conclusies te rechtvaardigen.

Het leek daarom wenselijk een nader onderzoek in te stellen naar de identiteit van de vector of vectoren van deze virussen, waarbij het werk in hoofdzaak beperkt bleef tot mozaïek I en heksenbezem, omdat de andere ziekten in de omgeving van Bogor gedurende de jaren van het onderzoek slechts weinig bleken voor te komen.

SYMPTOMEN

In sommige opzichten stemden de eigen waarnemingen niet overeen met de beschrijving, welke THUNG gaf van het mozaïek I. Daarom volgt hier een nieuwe beschrijving van deze ziekte en verder enkele aanvullende opmerkingen over de symptomen van de heksenbezem-ziekte en een discussie van THUNG's mozaiek II.

a. Mozaïek I

De eerste symptomen worden zichtbaar op het jongste, zich juist ontplooiende blad. Zij bestaan uit een gele verkleuring van alle nerven en nerfjes. Dit beeld is duidelijk, doch in het veld nog weinig opvallend (Fig. 1 boven). Na enkele dagen verdwijnt dit fijn getekende netwerk om plaats te maken voor een gele streping op en langs de zijnerven. Aanvankelijk is de afscheiding tussen deze gele strepen en de nog groene delen van het blad vrij scherp en op dit moment is het verschijnsel ook in het veld zeer opvallend. Korte tijd later vervagen de gele strepen, doordat ook het overige van het blad verkleurt. Het wordt spoedig bruin gevlekt door een schimmelaantasting en sterft voortijdig af. De beschreven verkleuringen komen niet steeds tegelijkertijd voor op alle vier blaadjes van één blad: soms blijven een of twee aanvankelijk groen, om later hetzelfde beeld te vertonen. Dit complex symptomen wordt hier „stadium A" van het mozaïek I genoemd.

De volgende aan dezelfde stengel gevormde bladeren vertonen een ander beeld. Reeds tijdens het ontplooien is het grootste deel van de blaadjes chlorotisch, vooral aan de top en langs de randen. De top is vaak abnormaal spits en de randen van het blaadje zijn vrij sterk gegolfd (Fig. 1, midden). De blaadjes blijven kleiner dan normaal. De volgende bladeren aan dezelfde as vertonen hetzelfde beeld dikwijls nog meer uitgesproken, waarbij de kleur van de chlorotische delen bijna wit kan worden. De stengel groeit nu vrijwel niet meer, waardoor de bladeren dicht opeen komen te staan. Deze verschijnselen worden „stadium B" genoemd.

Wanneer de plant op jeugdige leeftijd werd geïnfecteerd, blijft de hoofdscheut kort en groeien de zijscheuten slechts weinig uit. Daardoor ontstaat een gedrongen bosje, dat inderdaad vrij sterk doet denken aan de beschrijving van de Afrikaanse „chlorotic rosette".

Het virus verspreidt zich blijkbaar snel door de plant, want wanneer deze op oudere leeftijd op een van de takken is geïnfecteerd, worden de symptomen vaak reeds na enkele dagen zichtbaar op de andere takken van de plant.

In potproeven werd meermalen waargenomen, dat planten, welke de boven beschreven symptomen vertoond hadden, enkele weken later bladeren vormden, die op een vrijwel normaal groene ondergrond een groot aantal onregelmatig gevormde helgele vlekken vertoonden, welke zeker niet door schimmels veroorzaakt waren. Vaak werden planten met soortgelijk gevlekte bladeren ook in het veld gevonden, waarbij gewoonlijk de symptomen van de stadia A en B ontbraken. Proeven ter overbrenging van deze „mottling" met insecten gaven geen duidelijke bewijzen, dat deze symptomen worden teweeggebracht door hetzelfde virus dat de eerstbeschreven verschijnselen veroorzaakt. Desondanks worden zij hier „mozaïek I, stadium C" genoemd (Fig. 1, onder).

b. Heksenbezem

THUNG's reeds genoemde beschrijving van de heksenbezemziekte was niet geheel volledig. In een latere publicatie (THUNG & TOJIB HADIWIDJAJA, 1951) werd nader gewezen op de negatieve geotropie van de gynoforen. Bij een vroegtijdige infectie van deze organen staan zij rechtop in de bladoksels, in plaats van normaal neerwaarts te buigen. Wanneer het virus het groeipunt van de gynofore bereikt, als de top reeds in de grond is gedrongen, dan buigt deze om en verschijnt op enige afstand van de plant weer boven de grond. De vrucht ontwikkelt zich dan slechts gebrekkig of in het geheel niet.

Deze negatieve geotropie blijft echter niet beperkt tot de gynoforen, doch geldt ook voor alle andere groeiende bovengrondse delen van de zieke plant. Zoals THUNG reeds opmerkte, lopen slapende okselknoppen uit tot takjes, welke bij een gezonde plant nooit gevormd worden. Daarnaast is duidelijk een proliferatie van de bloemen waar te nemen. Kelk en kroon kleuren groen en worden, evenals meeldraden en stamper, tot blaadjes vervormd (Fig. 2). Indien de bloem reeds in knoptoestand wordt geïnfecteerd, is bij het opengaan nauwelijks iets meer te bespeuren van de bloemdelen en ontstaat in plaats daarvan een twijgje met kleine enigszins afgeronde blaadjes. Afhankelijk van het tijdstip, waarop het virus de bloem bereikte, zijn alle overgangen tussen een normale bloem en een takje met blaadjes te vinden (Fig. 3). Alle op deze wijze ontstane abnormale takjes zijn eveneens duidelijk negatief geotroop, waardoor een gedrongen dicht bosje ontstaat met een groot aantal stijf rechtopstaande takken en takjes. De naam heksenbezem is dan ook wel zeer toepasselijk voor dit ziektebeeld.

c. Mozaïek II

In de kas gekweekte planten vertoonden meermalen bladverkleuringen, welke geheel overeenkwamen met THUNG's beschrijving van mozaïek II. Deze symptomen werden ook meermalen gevonden op planten, die buiten het bereik van insecten onder kooien uit zaad waren gekweekt. Gewoonlijk groeiden deze planten geheel normaal – behalve enige etiolering – tot op een leeftijd van ongeveer twee maanden plotseling het door THUNG beschreven donkergroene netwerk van nerven op het bleekgele jongste blad zichtbaar werd. Dit netwerk verdween, wanneer het betreffende blad ouder werd om opnieuw te verschijnen op de volgende zich ontplooiende bladeren.

Hetzelfde werd meermalen waargenomen op planten in de volle grond. Hier kwamen de verschijnselen gewoonlijk pleksgewijze voor en vooral in perioden

met abnormaal weinig regenval. Verscheidene malen werd opgemerkt, dat de kleur van alle bladeren op zo'n plek na enkele regenbuien volkomen normaal was geworden.

Deze waarnemingen duiden meer op een verstoring van het evenwicht in het metabolisme van de plant dan op een virusaantasting. Zolang geen vollediger kennis is verkregen over dit onderwerp is het gerechtvaardigd aan te nemen, dat bepaalde symptomen, welke het gevolg zijn van ongunstige groeicondities, niet zijn te onderscheiden van die, welke door THUNG's mozaïek II veroorzaakt worden. Verder onderzoek dient uit te maken, of en wanneer men te maken heeft met een virusziekte, dan wel met deficiëntie-verschijnselen in de plant.

OVERBRENGING VAN DE VIRUSSEN VAN MOZAÏEK I EN HEKSENBEZEM

Bij een inventarisatie met behulp van een sleepnet bleek de insectenfauna in een aardnotenaanplant zeer rijk te zijn. Echter waren slechts enkele soorten het gehele jaar door in belangrijke aantallen aanwezig, nl. een bladluis-soort en een drietal soorten jassiden. Andere insectensoorten werden of slechts incidenteel of alleen in een bepaald jaargetijde regelmatig gevonden. Het lag dus voor de hand na te gaan, of één van de vier bovengenoemde insecten de virussen van mozaïek I en heksenbezem kon overbrengen.

a. Mozaïek I

De proeven werden begonnen met de bladluis, deels als een herhaling van THUNG's werk, deels omdat de enige in Afrika bekende vector van rosette disease eveneens een bladluis is. Zelfs bleek bij determinatie de bij Bogor voorkomende soort dezelfde te zijn als de Afrikaanse vector, nl. *Aphis craccivora* KOCH (= *A. medicaginis* KOCH op pag. 292 van KALSHOVEN's handboek).[1])

In een aantal infectieproeven met deze bladluis werd gebruik gemaakt van exemplaren, die gedurende enige tijd op zieke planten in de kas waren gekweekt, waarna zij op proefplanten onder kooien werden overgebracht. De dieren bleven van 4 tot 10 dagen op de zieke plant en daarna van 10 tot 17 dagen op de proefplant. De tijd tussen de dag, waarop de dieren op de zieke plant werden gebracht en het einde van de voedingsperiode op de proefplant variëerde tussen 14 en 25 dagen en was dus hoogstwaarschijnlijk ruim voldoende om de invloed van een eventuele latente periode te elimineren. In andere proeven werden de luizen verzameld van mozaïekzieke planten in het veld. Gewoonlijk werd gewerkt met groepen van 15 exemplaren tezamen.

In geen enkel geval vertoonden de proefplanten, die gedurende verscheidene weken ter observatie werden aangehouden, ook maar het geringste symptoom van mozaïek I. Het lijkt daarom onwaarschijnlijk, dat *Aphis craccivora* een vector is van het virus van mozaïek I op Java.

Dit resultaat zou er op kunnen wijzen, dat mozaïek I inderdaad wordt veroorzaakt door een ander virus dan rosette disease. Het is echter ook mogelijk, dat het virus hetzelfde is, doch dat de Javaanse bladluis een „inactief ras" is van de vector, op dezelfde wijze als er een „actief" en een „inactief ras" bestaan van de vector van het maize streak virus, *Cicadulina mbila* (NAUDÉ) (STOREY, 1932).

[1]) De Heer D. HILLE RIS LAMBERS bevestigde de juistheid van deze determinatie; de luizen bleken identiek met materiaal van *A. craccivora* afkomstig van *Arachis* uit Afrika.

Van de jassiden [1]) bleken twee soorten, nl. *Empoasca sundaica* BERGMAN en *Erythroneura tripunctula* (MELICH) niet in staat het virus over te brengen. Infectieproeven met de derde soort, *Orosius argentatus* (EVANS) [2]) gaven vrijwel zonder uitzondering duidelijke symptomen van mozaïek I, stadia A en B en soms ook stadium C op de proefplanten. Dit resultaat werd zowel bereikt met exemplaren, welke in een sterk door mozaïek aangetast veld waren gevangen en direct op de proefplanten waren gebracht, als met exemplaren, die zich eerst gedurende enige tijd op mozaïekzieke planten onder kooien in de kas hadden gevoed.

Dit is het eerste geval in Indonesië van de overbrenging van een virus door een cicadellide.

Een drietal malen werd de gehele met een sleepnet gemaakte vangst (behalve de daarin voorkomende exemplaren van *O. argentatus*) op een proefplant gebracht. Deze vangsten bevatten naast de bekende cicadelliden enkele sprinkhanen (welke na enkele dagen moesten worden verwijderd omdat zij de plant te ernstig beschadigden), *Thrips* spec., in één geval twee exemplaren van *Halticus tibialis* Reut., en vele Hymenoptera en Diptera.

In alle gevallen bleven de planten gezond, terwijl de planten, waarop de in deze vangsten voorkomende exemplaren van *O. argentatus* werden gebracht, in twee van de drie gevallen mozaïekziek werden. Van het bestaan van eventuele andere vectoren bleek dus in deze proeven niets. Evenmin konden enkele wantsen-soorten (*Nezara viridula* L., nymfen van wantsen uit de families *Coreidae* en *Plataspidinae*), welke meermalen op aardnootplanten werden aangetroffen, het virus overbrengen.

b. Heksenbezem

Het bleek niet mogelijk, heksenbezem over te brengen met behulp van *Aphis craccivora*, *Empoasca sundaica* of *Erythroneura tripunctula*. In een groot aantal infectieproeven met *Orosius argentatus* werden slechts op een drietal proefplanten duidelijke symptomen van heksenbezem veroorzaakt. De verschijnselen werden pas na 11 tot 13 weken zichtbaar, terwijl de ziekte in het veld gewoonlijk reeds kan worden gevonden op ongeveer zes weken oude planten. De redenen van het geringe slagingspercentage van de overbrenging en van de lange incubatietijd van het virus in de plant zijn niet bekend. Een onderzoek naar het bestaan van mogelijke andere vectoren bleef onvoltooid.

BIBLIOGIE VAN DE VECTOR *OROSIUS ARGENTATUS* (EVANS)

De eieren worden meestal gelegd in het schorsweefsel van de bladstelen, maar ook in dat van de jongste delen van de stengel en in de bladnerven en de bladrand. Soms liggen zij in groepjes van twee of drie bijeen. Zij zijn uitwendig niet zichtbaar, behalve kort voor het uitkomen, wanneer zij als kleine ovale verhevenheden van een enigszins afwijkende kleur in het plantenweefsel kunnen worden herkend.

Het eistadium duurt gewoonlijk 9-10 dagen. De nymfen zijn volwassen na een vijftal vervellingen. Het eerste nymfestadium duurt gewoonlijk 3 dagen, het

[1]) Een beschrijving van *Empoasca sundaica* nov. spec. en tekeningen van *Erythroneura tripunctula* en *Orosius argentatus* zijn verschenen in Entomologische Berichten no. 16: 64.

[2]) Det. Dr. EVANS.

tweede, derde en vierde vergt ieder 2–3 dagen en het vijfde 4–5 dagen. De totale ontwikkelingsduur van het uitkomen van het ei tot het volwassen insect is meestal 14–16 dagen.

De levensduur van het volwassen wijfje was in het laboratorium 5–7 weken. Bij virusproeven, waar gebruik werd gemaakt van onbevruchte wijfjes, gelukte het soms de dieren meer dan tien weken in leven te houden. De mannetjes sterven waarschijnlijk reeds binnen enkele weken.

Het aantal eieren gelegd door een wijfje was in kweekproeven maximaal 214. Het grootste aantal eieren door een wijfje in een dag gelegd bedroeg 16, maar gewoonlijk is dit niet meer dan vijf.

Bevruchting is noodzakelijk voor de voortplanting. Gedurende de eerste twee tot drie dagen na de paring worden geen levensvatbare eieren gelegd.

Bovengenoemde resultaten komen vrij goed overeen met de cijfers, die Helson (1942) verkreeg bij zijn onderzoek naar de ontwikkelingsduur van dezelfde soort in Australië, waar hij zijn insecten kweekte bij een constante temperatuur van 22 °C (de gemiddelde temperatuur in Bogor is 24,5 °C).

Alle nymfestadia, ook de jongste, zijn zeer actief en kunnen evenals de volwassen insecten uitstekend springen en bij verontrusting zijdelings lopend over de bladrand glippen. De volwassen dieren kunnen goed over korte afstanden vliegen.

O. argentatus voedt zich bij voorkeur zittend op de onderzijde van het blad, doch men vindt het insect ook vaak zuigend op de bladsteel, de jongere delen van de stengel of op de bladbovenzijde. Volgens Helson onttrekt het zijn voedsel aan het floëem van de vaatbundels van de door hem gebruikte proefplant *Malva parviflora* (L.). Day en medewerkers (1952) vonden echter, dat *O. argentatus* alle soorten weefsel van *Malva* en enkele andere plantensoorten aansteekt, doch dat een steek, die het floëem van deze planten treft, langer duurt dan een in parenchym. Ook was zo'n steek belangrijk groter van afmetingen, zoals uit weefselcoupes bleek. Volgens hen is het dier echter niet in staat het floëem van buitenaf te localiseren en berust het vinden ervan min of meer op toeval. Wel blijkt het dier het weefsel te kunnen onderscheiden, wanneer de styletten het bereikt hebben.

Ook bij *Arachis* steekt *O. argentatus* dikwijls het floëem aan. Meermalen kon in weefselcoupes door kleuring van de gevormde speekselschede waargenomen worden, dat een steek eindigde in een vaatbundel; de vaten waren dan beschadigd en verstopt. Ook bleek de duur van een steek afhankelijk van de plaats, waar de styletten werden ingebracht. Zo trekt het dier na een steek in het bladmoes de styletten vrij spoedig weer terug, terwijl steken in een van de vele bladnerven, de bladsteel of de stengel gewoonlijk van veel langere duur zijn. Uit de pompende bewegingen van het dier en het wegslingeren van faeces-druppels kan worden geconcludeerd, dat gedurende die tijd vrijwel onafgebroken voedsel wordt opgenomen.

De steek van *O. argentatus* is uitwendig niet zichtbaar, omdat de cellen rondom de steekplaats niet afsterven.

Het bleek mogelijk het insect in het laboratorium op de volgende planten te kweken: *Phaseolus radiatus* L., *Vigna sinensis* Endl., *Glycine max* Merr., *Tephrosia vogelii* Hook., *T. candida* DC., *Crotalaria usaramoensis* Bak., *C. juncea* L. (alle *Leguminosae*) en *Solanum melongena* L. (*Solanaceae*).

In het veld werd het insect vaak gevangen op de volgende planten: *Crotalaria*

usaramoensis Bak., *C. anagyroides* H.B.K., *Clycine max* Merr., *Medicago sativa* L. (alle *Leguminosae*).

Volwassen exemplaren waren in staat verscheidene dagen in leven te blijven op de volgende planten: *Porophyllum ruderale* Cass., *Ageratum conizoides* L. (beide *Compositae*), *Calopogonium mucunoides* DC. (*Leguminosae*), *Solanum tuberosum* L. en *Nicotiana tabacum* L. (beide *Solanaceae*). Nymfen, die gedwongen werden zich op deze planten te voeden, stierven echter voor zij volwassen waren.

Ongetwijfeld is het aantal waardplanten van *O. argentatus* op Java nog belangrijk groter. Helson (1942) publiceerde een uitgebreide lijst van planten behorende tot tien families, waarop het dier zich in Australië bleek te kunnen voeden.

Om een indruk te krijgen van de grootte van de populatie van *O. argentatus* in de verschillende jaargetijden (regenrijke en -arme perioden), werden gedurende vijftien maanden (juni 1953 augustus 1954) driemaal per week met een sleepnet vangsten in aardnoot-aanplanten gedaan. Dit geschiedde in twee naast elkaar gelegen velden, die afwisselend op zodanige wijze werden beplant, dat wanneer het ene veld werd geoogst, de planten in het andere veld ongeveer een maand oud waren. Gedurende dezelfde periode werd de neerslag dagelijks genoteerd. De resultaten van dit onderzoek zijn samengevat in Fig. 4. Ieder punt van de gebroken lijnen hierin geeft het gemiddelde aan van de drie opeenvolgende hoogste weekvangsten in één aanplant. Deze weekvangsten zijn dus ieder weer de totalen van een drietal opeenvolgende waarnemingen. In genoemde periode van vijftien maanden kon gebruik worden gemaakt van een zevental aanplanten, zodat iedere lijn dus slechts zeven punten heeft. De duur van het onderzoek, noch de gebruikte werkwijze bij het vangen (een zo goed mogelijk gestandaardiseerde sleepnetmethode) rechtvaardigen het trekken van definitieve conclusies, maar laten wel het maken van enkele opmerkingen toe.

Het is opvallend, dat *O. argentatus* gedurende de observatieperiode nimmer zeer talrijk was, doch dat anderzijds de populatiedichtheid van deze soort veel minder schommelde dan die van de beide andere cicadelliden-soorten, die eveneens in de grafiek zijn opgenomen. *Erythroneura tripunctula* was talrijk in de droge maanden juli en augustus 1953 en gedurende een korte periode in november, doch veel minder talrijk gedurende de daaropvolgende regenrijke maanden (de „droge" tijd van 1954 was abnormaal regenrijk). De populatiedichtheid van *Empoasca sundaica* nam snel af gedurende de laatste maanden van het droge seizoen in 1953 en de eerste van de daaropvolgende regenmaanden en bereikte wederom een hoge waarde gedurende de minder natte maanden maart en april 1954. Hoewel de schommelingen in de aantallen van *O. argentatus* veel geringer zijn, is enige afneming in aantal te constateren gedurende bijzonder regenrijke maanden (november 1953 en juni–juli 1954).

Wellicht is het mogelijk deze verschillen ten dele te verklaren als men rekening houdt met de verschillen in de voedingsgewoonten van de drie soorten. Zoals gezegd, voedt *O. argentatus* zich zowel op bladeren, bladstelen en stengels van de aardnoot en bij voorkeur op de daarin aanwezige vaatweefsels. *E. tripunctula* steekt vrijwel steeds het parenchym aan van volgroeide, niet te oude bladeren, terwijl *E. sundaica* een uitgesproken voorkeur heeft voor het parenchym van jonge, nog niet volledig uitgegroeide bladeren. Bij langdurige droogte (b.v. tijdens de maanden augustus september 1953) wordt zeer weinig nieuw

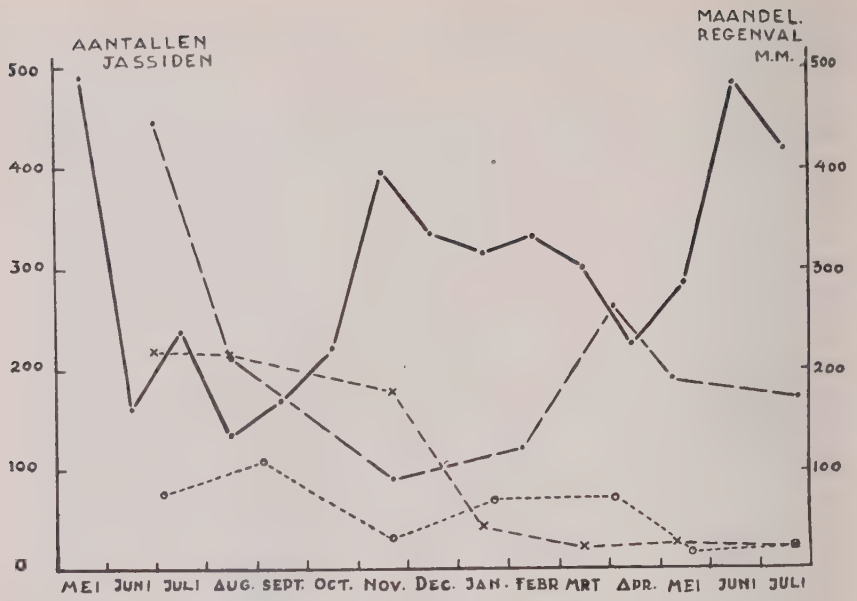


FIG. 4. Hoogste populatiedichtheden van een drietal soorten cicadelliden van de aardnoot, die bereikt werden in 7 opeenvolgende aanplanten gedurende een periode van 15 maanden.

Highest population densities of three species of cicadellids of the groundnut, attained in 7 consecutive plantings during a period of 15 months.

• —— —— • *Empoasca sundaica*
× — — — × *Erythroneura tripuncula*
o – – – – – o *Orosius argentatus*
• ———— • maandelijkse regenval
monthly rainfall

blad gevormd, zodat *E. sundaica* gedurende zulk een periode weinig geschikt voedsel kan vinden. *E. tripunctula*, doch vooral de floëemvoeder *O. argentatus* zullen door deze omstandigheid veel minder ongunstig worden beïnvloed. Perioden van zeer hoge regenval doen de aantallen van alle drie soorten afnemen, waarschijnlijk vanwege de directe mechanische werking van de zware tropische buien op deze tere insecten. Hoewel *O. argentatus* hiertegen beter bestand lijkt, omdat vooral de nymfen maar ook de volwassen exemplaren van deze soort veel sterker en actiever zijn dan die van de beide andere soorten, is eenzelfde invloed van sterke regen ook hier merkbaar.

Ongetwijfeld zijn ook andere invloeden dan regenval en kwaliteit van het voedsel van invloed. Zo wordt b.v. niet op deze wijze verklaard, waarom *O. argentatus* gedurende de gehele waarnemingsperiode nimmer bijzonder talrijk was, terwijl de reproductie-capaciteit veel groter is dan die van de andere soorten. Verder worden zowel *E. sundaica* als *E. tripunctula* geparasiteerd door de larven van sluipwespen van de familie *Dryinidae* [1]), welke echter nooit bij *O.*

[1]) Een beschrijving van een van deze parasieten (*Aphelopus maculiceps* spec. nov.) verschijnt binnenkort in Entomologische Berichten.

argentatus gevonden zijn. Het is zeer wel mogelijk, dat het bestaan van andere parasieten, zoals de op de eieren van vele cicadelliden-soorten parasiterende *Mymaridae*, aan de aandacht zijn ontsnapt.

De invloed van de kwaliteit van het voedsel op de reproductie-capaciteit, vooral van zuigende insecten, is meermalen geconstateerd. Hoewel het wenselijk scheen, hierop in dit verband te wijzen, evenals op de directe mechanische werking van zware tropenregens op deze insecten, mag toch de invloed van deze factoren niet los worden gezien van het totale complex van biotische en abiotische factoren, hetgeen dusdanig ingewikkeld zal zijn, dat een veel uitgebreider onderzoek voor een meer volledig inzicht nodig is.

Wel kan worden geconstateerd, dat *O. argentatus* gedurende de gehele waarnemingsperiode in zodanig grote aantallen aanwezig was, dat zijn rol als vector van het mozaïek I niet mag worden onderschat, vooral daar, waar gedurende het gehele jaar aanplanten van de aardnoot of van andere waardplanten van het insect te velde staan, zoals in de proeftuin waar het beschreven onderzoek plaats vond.

VERHOUDING TUSSEN HET VIRUS VAN MOZAÏEK I EN ZIJN VECTOR

Met zekerheid is gebleken, dat het virus van mozaïek I behoort tot de groep van de zogenaamde persistente virussen.

THUNG vond reeds, dat het virus niet langs mechanische weg kan worden overgebracht, welke eigenschap gewoonlijk een van de kenmerken is van de persistente virussen.

Verder bleek *O. argentatus* gedurende enige tijd na het zuigen op een zieke plant niet in staat te zijn het virus op een gezonde plant over te brengen. Deze latente periode variëerde van 8 tot 17 dagen, gerekend van de dag, waarop de dieren van de zieke plant werden afgenomen.

Tenslotte kon worden aangetoond, dat de vector na het doormaken van de latente periode gedurende lange tijd en dikwijls voor de duur van het leven infectieus bleef. Ter illustratie hiervan diene de volgende proef. Een tweetal nymfen van *O. argentatus* afkomstig uit een virusvrije kwekerij werd voor de duur van drie dagen op een mozaïekzieke plant geplaatst. Na deze „infectie-voeding" werden zij tezamen overgebracht op een jonge gezonde plant, waar zij gedurende een dag bleven en waarna zij op een nieuwe proefplant werden gezet. Deze dagelijkse overbrenging werd voortgezet tot 77 dagen na het einde van de voedingsperiode op de zieke plant. Op dit tijdstip waren beide dieren nog in leven doch door gebrek aan ruimte moesten zij verder op deze plant blijven tot zij enkele dagen later beide stierven.

De resultaten van deze proef zijn samengevat in Tabel I. Hieruit blijkt wederom het bestaan van een latente periode, ditmaal van 8 dagen. Verder is het duidelijk dat minstens een van beide dieren 77 dagen na de „infectie-voeding" nog virulent was. In andere soortgelijke proeven bleven de dieren eveneens gedurende verscheidene weken infectieus.

Verder valt uit de tabel op, dat de reeks van planten, welke geïnfecteerd werden, telkens onderbroken is door een of meer planten, die gezond bleven. Dit verschijnsel is bekend uit soortgelijke proeven met andere virussen en hun vectoren, doch nog niet volledig verklaard.

Er is geen aanwijzing in deze proef, dat het infecterend vermogen van de

dieren afnam naarmate het langer geleden was dat zij zich op de virusbron voedden: 14 van de eerste 20 planten (de eerste 8 niet medegerekend) werden ziek, terwijl 12 van de laatste 20 planten (no. 77 niet medegerekend) mozaïeksymptomen vertoonden. Dit is in tegenspraak met de resultaten met andere virussen en hun vectoren, waar gewoonlijk het insect steeds minder in staat bleek de proefplanten te infecteren. Waarschijnlijk is dit afwijkende resultaat een gevolg van het gebruik van twee insecten tezamen, als gevolg waarvan geen duidelijk beeld van het infecterend vermogen van het individu werd verkregen.

De in deze proef gebruikte nymfen werden volwassen op de dag dat zij op plant 9 resp. 11 zogen, m.a.w. de planten 9 en 10 werden geïnfecteerd toen reeds één van de insecten volwassen was. Ook in andere proeven werd nooit een infectie tot stand gebracht door een nymfe. De conclusie dat slechts het volwassen dier organisch geschikt is vector te zijn is echter voorbarig, gezien de lengte van de latente periode en de ontwikkelingsduur van het insect, daarbij rekening houdend met het feit, dat de dieren bij het begin van de proeven steeds minstens het 3e nymfestadium hadden bereikt.

TABEL I. Infecties van aardnootplanten tengevolge van het zuigen van een tweetal exemplaren van *O. argentatus* gedurende opvolgende perioden van 24 uur.
Infections of groundnut plants resulting from the feeding of two specimens of O. argentatus for successive 24-hour periods.

No. v. d. plant *No. of plant*	Infectie *Infection*	No. v. d. plant *No. of plant*	Infectie *Infection*	No. v. d. plant *No. of plant*	Infectie *Infection*	No. v. d. plant *No. of plant*	Infectie *Infection*	No. v. d. plant *No. of plant*	Infectie *Infection*	No. v. d. plant *No. of plant*	Infectie *Infection*
1	–	14	+	27	+	40	–	53	+	66	+
2	–	15	+	28	–	41	+	54	+	67	–
3	–	16	–	29	–	42	+	55	+	68	+
4	–	17	+	30	+	43	+	56	+	69	+
5	–	18	+	31	+	44	+	57	–	70	–
6	–	19	–	32	+	45	+	58	–	71	–
7	–	20	+	33	+	46	+	59	+	72	+
8	–	21	+	34	+	47	–	60	+	73	–
9	+	22	–	35	+	48	–	61	–	74	+
10	+	23	+	36	+	49	+	62	+	75	–
11	+	24	–	37	–	50	+	63	+	76	+
12	+	25	–	38	–	51	–	64	+	77	+
13	+	26	+	39	–	52	+	65	+		

De tijd verstrijkend tussen de datum van infectie en de dag, waarop de symptomen op de plant zichtbaar werden, variëerde tussen 5 en 19 dagen en was gewoonlijk 8 tot 13 dagen. Er is een geringe aanwijzing, dat deze incubatietijd in de plant enigszins langer was in de laatste planten van de serie in de bovengenoemde proef dan in de eerste. Ook was deze periode gewoonlijk langer dan de gemiddelde waarde, indien een enkel insect als vector werd gebruikt.

Op beperkte schaal werd nagegaan, hoelang *O. argentatus* minstens op een zieke plant moet zuigen om het virus op een gezonde plant te kunnen overdragen (de zgn. acquisition threshold period). Tweemaal bleek een exemplaar infectieus na slechts 15 minuten zuigen op een mozaïekziek blad. Uit de literatuur zijn echter veel kortere voedingstijden bekend, zodat het mogelijk moet

SCANNED 225 of 256

worden geacht dat bij verder onderzoek deze periode ook hier belangrijk korter blijkt te zijn.

ANDERE JASSIDEN, SCHADELIJK OP AARDNOOT

In het voorgaande werd reeds melding gemaakt van een tweetal andere jassidensoorten, die steeds in aardnoot-aanplanten kunnen worden gevonden. Beide soorten zijn in KALSHOVEN's boek op blz. 270–271 vermeld onder de naam „Empoasca spec.". Hoewel noch *Empoasca sundaica* noch *Erythroneura tripunctula* in staat zijn de virussen van mozaïek I en heksenbezem over te brengen, zijn zij in staat belangrijke schade aan te richten. Beide soorten hebben een belangrijk geringere reproductie-capaciteit dan *O. argentatus*, doch kunnen desondanks soms in enorme aantallen in het gewas voorkomen en dan belangrijke bladvergelingen veroorzaken. De steken van beide soorten veroorzaken necrotische plekjes in het bladmoes. Die van *E. tripunctula*, welke voornamelijk het volgroeide blad aansteekt, zijn helderwit en liggen gewoonlijk in groepen bijeen. *E. sundaica* steekt in hoofdzaak het jongste, nog geheel of ten dele dichtgevouwen blad aan. In volgroeide toestand vertoont het aangestoken blad gelige vlekken langs de hoofdnerf, die bij nadere beschouwing bestaan uit een groot aantal kleine necrotische plekjes van gele of bruine kleur, die het verlies van een niet onbelangrijk deel van het assimilatie-apparaat kunnen betekenen.

In de „Jaaroverzichten van Ziekten en Plagen", door het Instituut voor Plantenziekten uitgegeven gedurende de jaren 1913–1939, is meermalen melding gemaakt van schade in aardnootaanplanten, veroorzaakt door „groene cicadelliden" of door „*Empoasca flavescens*" in alle streken van Java, waar dit gewas op grotere schaal werd verbouwd. In sommige jaren werd de schade aanzienlijk genoemd, hoewel steeds – voor zover vermeld – op beperkte oppervlakten. Zeer waarschijnlijk hebben deze meldingen betrekking op de schade aangericht door *Empoasca sundaica*, aangezien in het verleden alle soorten groene cicadelliden „*E. flavescens*" werden genoemd. KALSHOVEN rekent de cicadelliden van de aardnoot tot de plagen, welke zeker tot belangrijke verliezen kunnen leiden en dan bestreden dienen te worden.

BESTRIJDING

ANKERSMIT & VAN DER LAAN (1951) bestreden de cicadelliden-plagen van de katoen in Oost-Java succesvol met DDT. Daarom werd nagegaan, of DDT eenzelfde gunstig effect had in de bestrijding van de jassiden van de aardnoot. Naast dit insecticide werden nog enkele van de in Indonesië meest gebruikelijke middelen op hun werking onderzocht. DDT, eenmaal per week verspoten in een concentratie van 0,1 %, bleek ook hier zeer gunstige resultaten te geven, terwijl HCH (als spuitpoeder en als emulgeerbare olie) in diverse concentraties geen effect had, evenmin als een derrispoeder-suspensie van verschillende rotenon-gehalten. Er zijn aanwijzingen, dat ook toxapheen effectief is in de gebruikelijke concentraties. Deze resultaten gelden voor alle drie soorten jassiden.

Zoals gezegd, kunnen *E. sundaica* en *E. tripunctula* onder bepaalde omstandigheden in zulke aantallen voorkomen, dat een chemische bestrijding gerechtvaardigd is. Doch ook de bestrijding van de vector *Orosius argentatus* kan soms

van groot belang zijn, o.a. in proeftuinen, waar het gehele jaar door aardnoten in selectie- of vermeerderingsaanplanten geteeld worden in de nabijheid van groenbemesters, die waardplanten van dit insect zijn. In de veldjes, waar het populatie-onderzoek werd verricht en waar gedurende vijftien maanden één of beide vakken beplant waren met *Arachis*, steeg het percentage mozaïekzieke planten tot een dusdanige hoogte (meer dan 75 %!), dat dit een van de redenen was voor de beëindiging van het populatie-onderzoek. Ook in andere aanplanten in de proeftuin van de Landbouwfaculteit, in welke tuin wel steeds ergens *Arachis* groeide, terwijl in vele vakken groenbemesters zoals de *Crotalaria*-soorten geteeld werden, was het percentage viruszieke planten gewoonlijk hoog. In een deel van de bestrijdingsproeven werkten de omstandigheden mede tot de vorming van zeer grote populaties cicadelliden. In zulke veldjes bleek het aantal viruszieke planten in de met DDT behandelde vakken belangrijk lager dan in de controles en in de met andere insecticiden behandelde veldjes. Zo was in een proefje zonder herhalingen, waarin zeer grote aantallen cicadelliden werden geconstateerd in alle, behalve het met DDT bespoten vak, 20 % van de met DDT behandelde planten mozaïekziek, terwijl 46 % van de met HCH bespoten planten en 51 en 40 % van de planten in de twee controlevakken mozaïeksymptomen vertoonden. Het met DDT behandelde veldje grensde daarbij, evenals een van de controles, aan een oudere aardnoot-aanplant, welke zeer sterk mozaïekziek was. Verdere proeven ter bevestiging van dit en soortgelijke resultaten zullen echter nodig zijn om uit te maken, of inderdaad de bestrijding van de vector – in gevallen dat deze talrijk is – tevens een bestrijding betekent van de virusziekten.

Daar in het algemeen op Java slechts eenmaal per jaar en wel gedurende de droge tijd op de dan niet bevloeibare rijstvelden aardnoten worden geteeld, zullen gewoonlijk de virusziekten van dit gewas geen bijzonder belangrijke rol spelen, zoals bevestigd werd door tellingen van viruszieke planten in bevolkingsaanplanten in de omgeving van Bogor. In het kader echter van het streven naar een verhoging van de voedselproductie van het zeer dichtbevolkte eiland Java wordt steeds meer de nadruk gelegd op de verbouw van zgn. drogegrondgewassen, waaronder de aardnoot een belangrijke plaats inneemt, mede door het hoge gehalte van de zaden aan de in het inheemse diëet zo schaarse eiwitten. Het lijkt hierom wenselijk van deze plaats te waarschuwen voor de gevaren, die het ontbreken van een geschikte vruchtwisseling op de niet-bevloeibare gronden met zich kunnen brengen in een land, waar in het algemeen de economische positie van de landbouwer het gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen niet toelaat.

In dit verband is het aan te bevelen, dat het onderzoek naar de waardplanten van de jassiden van *Arachis* wordt voortgezet. Voorts is een betere kennis van de waardplanten van de virussen – waarnaar zonder succes gezocht is – dringend gewenst.

SUMMARY

After a brief review of literature on virus diseases of the groundnut, *Arachis hypogaea* L., in Indonesia the descriptions of symptoms of THUNG's „mosaic I" and „witches' broom" are extended on basis of new observations. THUNG's

FIG. 1.

Bladeren van de aardnoot met symptomen van mozaïek I.

Boven: stadium A;
midden: stadium B;
onder: stadium C („mottling")

Groundnut leaves showing symptoms of mosaic I.

Upper: stage A;
middle: stage B;
lower: stage C („mottling").

FIG. 2.

Proliferatie van een bloem van een heksenbezemzieke aardnoot; slechts één meeldraad is nog normaal van vorm.

Flower proliferation of a witches' broom diseased groundnut; only one stamen has retained its normal form.

FIG. 3.

Tak van een heksenbezemzieke plant. In de onderste bladoksels normaal gevormde bloemknoppen naast abnormale zijtakken; in de bovenste bladoksels links korte takjes met zeer kleine blaadjes, waarschijnlijk ontstaan uit geprolifereerde bloemen.

Stem of a witches' broom diseased plant. Normal flower buds as well as abnormal shoots in the lower axils; upper axils at left show short shoots with very small leaves, probably formed from proliferated flowers.

„mosaic II" is discussed briefly because it seems probable that these symptoms may be caused by unfavourable growth conditions of the plant.

A number of transmission experiments with several insect species is described. All species but *Orosius argentatus* (EVANS) failed to transmit the viruses. *O. argentatus* proved to be a vector of mosaic I and perhaps also of witches' broom. The results of THUNG concerning the transmission of mosaic by *Aphis craccivora* KOCH, a vector of the African „rosette disease" of groundnuts, could not be confirmed. It could not be ascertained whether a „mottling" symptom often found is caused by the mosaic I virus.

O. argentatus usually oviposits in the petioles and the stems of the groundnut plant. The egg stage lasts 9–10 days, the larval period 14–16 days. The average oviposition rate is 5 eggs per day and the number of eggs laid by a single female is about 200.

The insect and its nymphs are very active. They often feed on the underside of the leaf, but also on the petioles and stems, preferably puncturing the phloem tissue of the vascular bundles. The puncture is not visible because no necrosis of the surrounding cells is caused but the vessels of the vascular bundles reached by the stylets are destroyed and often clogged by salivary secretion products. It was observed that this leafhopper when puncturing a leaf vein remained feeding for a considerable time, while when feeding on parenchyma tissue the stylets were withdrawn soon.

O. argentatus was collected from some *Leguminosae* and was reared in the laboratory on some other leguminous and non-leguminous plants.

During 15 months the population densities of *O. argentatus* and two other leafhopper species common on *Arachis* were estimated by means of net-sweepings at regular intervals. *O. argentatus* was never very numerous during the observation period but its numbers did not fluctuate as considerably as those of the other species. The possible influence of climate on these insects in relation to growth conditions of the plants are discussed.

The mosaic virus proved to be of the persistent type. The longest period for which specimens of *O. argentatus* remained infective was 77 days. The latent period of the virus in the insect body lasted at least 8 days.

Two other leafhopper species attacking *Arachis*, viz. *Empoasca sundaica* (BERGMAN) and *Erythroneura tripunctula* (MELICH) are discussed briefly. Both are not able to transmit the virus diseases, but they sometimes cause considerable damage when present in large numbers because their feeding results in the formation of necrotic spots in the parenchyma. This kind of damage has been recorded several times in the „Jaaroverzichten van Ziekten en Plagen" which were published by the Institute for Plant Diseases and Pests during the years 1913–1939.

In some tests with insecticides a spray of 0.1 % DDT, applied once a week, gave good control of the leafhoppers. There are some indications that the use of this insecticide may also reduce the percentage of virus diseased plants.

It was observed that when groundnuts and other food plants of *O. argentatus* are grown continuously, mosaic I may become very serious. Evidently an adequate crop rotation will prove to be the best control, but further research on the host plants of both the vector and the virus is necessary.

ANKERSMIT, G. W. & LAAN, P. A. VAN DER, – 1951. Resultaten van proeven met insecticiden ter bestrijding van insectenplagen in de landbouw in Indonesië. Landbouw 23: 423–484.

DAY, M. F., IRZYKIEWICZ, H. & MCKINNON, A., – 1952. Observations on the feeding of the virus vector Orosius argentatus (Evans), and comparisons with certain other Jassids. Aust. J. sci. Res. (B) 5: 128–141.

HELSON, G. A. H., 1942. The leafhopper Thamnotettix argentata Evans, a vector of tobacco yellow dwarf. J. Coun. sci. industr. Res., Aust., 15: 175–184.

HELSON, G. A. H., – 1951. The transmission of witches' broom virus disease of lucerne by the common brown leafhopper Orosius argentatus (Evans). Aust. J. sci. Res. (B) 4: 115–124.

KALSHOVEN, L. G. E., – 1950/1951. De plagen van de cultuurgewassen in Indonesië, deel I/II, 's-Gravenhage-Bandung.

RUTGERS, A. A. L., 1913. De krulziekte van katjang tanah. Meded. Afd. Pl.ziekten, Buitenz., no. 6.

RUTGERS, A. A. L., – 1915. Ziekten en plagen der cultuurgewassen in Nederlandsch Indië. Meded. Lab. Pl.ziekten, Buitenz., no. 15.

SCHWARZ, M. B., – 1927. Enige ziekten van onbekenden aard bij groenbemesters. Korte Meded. Inst. Pl.ziekten, Buitenz., no. 5.

STOREY, H. H., – 1932. The inheritance by an insect vector of the ability to transmit a plant virus. Proc. roy. Soc. B 112: 46–60.

STOREY, H. H. & BOTTOMLEY, A. M., – 1925. Transmission of a rosette disease of the groundnut. Nature 116: 97–98.

STOREY, H. H. & BOTTOMLEY, A. M., – 1928. The rosette disease of peanuts (Arachis hypogaea). Ann. appl. Biol. 15: 26–45.

THUNG, T. H., – 1946/1947. Virusziekten van Arachis hypogea. Landbouw 19: 337–347.

THUNG, T. H. & TOJIB HADIWIDJAJA, – 1951. Groeistof in verband met virusziekten, in het bijzonder bij Arachis hypogaea. T. Pl.ziekten 57: 95–99.

ZIMMERMANN, 1907. Ueber eine Krankheit der Erdnüsse (Arachis hypogaea). Der Pflanzer 3: 129–133.

T. Pl.ziekten 62 (1956): 305–321

ONDERZOEKINGEN OVER SCHIMMELS, DIE PARASITEREN OP DE CYSTE-INHOUD VAN HET AARDAPPELCYSTENAALTJE (*HETERODERA ROSTOCHIENSIS* WOLLENW.)

With a summary: Investigations on fungi, predacious on the cyst contents of the potato root eelworm (Heterodera rostochiensis WOLLENW.)

DOOR

P. A. VAN DER LAAN

Laboratorium voor Phytopathologie, Wageningen[1])

1. BIOLOGISCHE BESTRIJDING VAN OP PLANTEN PARASITERENDE AALTJES

De bestrijding van planteziekten met behulp van de natuurlijke vijanden van de ziekteverwekker of de plaag, lijkt altijd zeer aantrekkelijk. Weliswaar is de kans van slagen van een dergelijke bestrijding niet groot, daar men de oecologische omstandigheden, waaronder de vijand en zijn parasieten leven, veelal onvoldoende kent, maar toch wordt deze wijze van bestrijding steeds weer geëntameerd. In de gevallen immers, waar zij slaagt, wordt de kwaal ook voorgoed beteugeld.

Tot nu toe hebben bij de cystenaaltjes de directe bestrijdingsmethoden nog niet tot een succes geleid, ondanks vele jaren onderzoek. Wel zijn thans de resultaten van het resistentie-onderzoek, in het bijzonder met betrekking tot het aardappelcystenaaltje (*Heterodera rostochiensis* WOLLENW.) zeer hoopvol, doch op korte termijn moet men zijn verwachtingen in dit opzicht niet te hoog stellen.

Dat de vooruitzichten op een succesvolle biologische bestrijding van de aaltjes niet groot zijn, moge blijken uit de volgende kleine bloemlezing uit de literatuur.

Reeds MARCINOWSKI (1909) schonk in haar onderzoek over planteziekten veroorzakende aaltjes, aan de mogelijkheden van biologische bestrijding weinig aandacht, daar de vooruitzichten op praktische toepassing volgens haar niet groot zouden zijn. STEINER & HEINLI (1922) kweekten *Mononchidae* (grote roofaaltjes), doch potproeven mislukten helaas, en zij achtten de kans zeer gering, dat deze roofaaltjes van enig praktisch nut zouden kunnen zijn. BAUNACKE (1923) vestigde wel de aandacht op de verschillende mogelijkheden van biologische bestrijding, maar werkte er ook al niet verder over door. RADEMACHER & SCHMITT (1933), evenals de voorgaande onderzoeker over het bietecystenaaltje (*Heterodera schachtii* SCHMIDT) werkende, achtten parasieten van cystenaaltjes van weinig betekenis, daar er in Europa geen gevallen uit de praktijk bekend waren, waarbij parasieten de populatie der aaltjes beïnvloedden.

Ook THORNE (1928), die in de U.S.A. zeer veel over het bietecystenaaltje werkte, besteedde aandacht aan de natuurlijke vijanden van dit aaltje. Tijdens een studie van meer dan 38.000 cysten vond hij vaak andere soorten aaltjes in de cysten. Meestal waren dit echter kleine, vrijlevende aaltjes zonder stekel, die niet parasitair zijn (*Acrobeles*- en *Cephalobus*-soorten). Soms werd *Dorylaimus obtusicaudatus* aangetroffen, enkele malen met een ei op de stekel gespietst. Op een zo groot aantal cysten heeft dat evenwel niets te betekenen. LINFORD, YAP & OLIVEIRA (1938) vonden in potproeven met toevoeging van organische stof, waarin zich vele aaltjesvangende schimmels en roofaaltjes ontwikkelden, wel een afneming van de populatie van het wortelknobbelaaltje (*Meloidogyne* sp.), doch ook dit onderzoek leidde niet tot een toepassing

[1]) Gedetacheerd door de Werkgroep Onderzoek Bestrijding Aardappelcystenaaltje T.N.O.; thans: Laboratorium voor Toegepaste Entomologie, Amsterdam.

in de praktijk[1]). Eveneens kregen Franse onderzoekers (DESCHIENS c.s., 1943) bij *Meloidogyne* in potproeven enig resultaat na toevoeging van aaltjesvangende schimmels. Ook in Rusland verricht men de laatste jaren onderzoek over biologische bestrijding van *Meloidogyne* met deze aaltjesvangende schimmels (GORLENKO, 1956).

DOLLFUS (1946) beschreef in zijn lijvige bibliografie „Parasites des helminthes" wel een zeer groot aantal parasietesoorten van aaltjes, maar moest eveneens erkennen, dat de biologische bestrijding nog niet gerealiseerd kon worden. Meer dan 50 soorten aaltjesvangende schimmels werden door DRECHSLER (1941) beschreven. DUDDINGTON (1950) isoleerde vele aaltjesvangende schimmels, doch achtte het onderzoek naar de biologische bestrijding moeilijk, omdat daarvoor veel oecologische kennis nodig is. De parasitaire schimmels bleken vooral aanwezig in organisch rijke grond. GOFFART (1952), de verschillende soorten cystenaaltjes onderling vergelijkend, kwam tot de conclusie, dat *Heterodera rostochiensis* weinig parasieten heeft. Andere *Heterodera*-soorten, vooral *H. major* FRANKLIN en ook *H. schachtii*, bleken steeds een groter aantal beschimmelde, verrotte of loze cysten dan het aardappelcystenaaltje te vertonen. *H. rostochiensis* is blijkbaar een zeer vitale soort met grote weerstand tegen ongunstige uitwendige omstandigheden.

In hun overzicht over aaltjes als planteparasieten constateerden CHITWOOD & OTEIFA (1952), dat de natuurlijke vijanden der nematoden zeér talrijk zijn. Vele protozoën en bacteriën zijn bekend als parasieten van vrij levende aaltjes. De carnivore aaltjes hebben een te laag reproductievermogen, om een rol van betekenis te kunnen spelen. Hoopvoller waren de schrijvers gestemd ten opzichte van sommige parasitaire *Aphelenchoidae*, speciaal van het geslacht *Seinura*, gekenmerkt door een lange staart. Deze roofaaltjes vermenigvuldigen zich sneller, doch zijn niet specifiek in hun voedselkeuze.

HUTCHINSON & MAI (1954) entten de aaltjesvangende schimmel *Dactylaria eudermata* DRECHSL. op agarplaten met een dunne laag gesteriliseerde tuingrond. Na 10 dagen had de schimmel zich over de gehele plaat verbreid en werden er 5000 larven van *Heterodera rostochiensis* aan toegevoegd. Nadat de aaltjes drie weken met de schimmel in aanraking waren geweest, werd de inhoud van de plaat gemengd door een pot met steriele grond. Deze proef werd vele malen herhaald, doch had geen enkel positief resultaat.

Enkele gegevens zijn iets bemoedigender. De reeds boven aangestipte proeven van LINFORD c.s., DESCHIENS c.s. en GORLENKO met *Dactylella*-, *Dactylaria*- en *Arthrobotrys*-soorten, welke schimmels de aaltjes door middel van speciale vangapparaten vangen en doden, hadden in potten wel resultaat. Doch het onderzoek geschiedde bij *Meloidogyne*, die geen cysten vormt en waarvan de larven steeds in de grond verblijven. Bijzonder interessant is de waarneming van GOODEY (1938), dat *Arthrobotrys oligospora* zelfs de aaltjes (in dit geval *Ditylenchus dipsaci*) in de bladeren van planten aantastte. De genoemde schimmels dringen evenwel geen cysten binnen, zoals wij konden aantonen. Daar bij cystenaaltjes de larven de langste tijd binnen de cyste doorbrengen, ligt het voor de hand, dat dergelijke schimmels, die dus alleen de vrijlevende stadia aanvallen, als parasieten van cystenaaltjes van weinig betekenis zullen zijn.

Voorts verdient hier besproken te worden het onderzoek van SCHAERFFENBERG & TENDL (1951) over de betekenis van Enchytraeïden als aaltjes-vijanden. De schrijvers baseerden hun onderzoek op de waarnemingen van JEGEN (1920), die constateerde, dat bij aardbeien, aangetast door soorten van de aaltjesgeslachten *Tylenchus* en *Aphelenchoides*, Enchytraeïden van de genera *Enchytraeus*, *Pachydrilus* en *Fridericia* de ontwikkeling van genoemde aaltjessoorten remden. JEGEN veronderstelde, dat de Enchytraeïden door uitwendige vertering de aaltjes zouden doden, doch vermeldt hierover geen waarnemingen. Enchytraeïden komen speciaal in organisch rijke grond voor en geven vaak aanleiding tot betere structuur van de grond.

SCHAERFFENBERG & TENDL infecteerden potplanten van bieten met *Heterodera schachtii* en voegden daarna Enchytraeïden (*Fridericia* sp.) toe. Het resultaat van de proeven werd slechts beoordeeld aan de stand van de bieten en het uiteindelijk aantal cysten in de potten. Of de Enchytraeïden de aaltjes doodden werd niet geobserveerd. Gunstige resultaten werden verkregen, indien de Enchytraeïden werden toegevoegd aan bieteplanten met beginnende aaltjesaantasting. De bieten werden dan weer gezond, de controles zonder Enchytraeïden en met aaltjes, werden zieker. Het effect van de Enchytraeïden op bieten met oudere aaltjes-aantasting was juist omgekeerd: de Enchytraeïden hielpen de zieke bieten eerder aan hun einde dan de aaltjes alleen! De verklaring voor deze, deels gunstige invloed der Enchytraeïden op de aaltjesaantasting moet m.i. niet gezocht worden in het – nooit geconstateerde – feit dat de wormen

[1]) Ook blijft de vraag open, of inderdaad de aaltjesvijanden de geringere aaltjes-aantasting in deze proeven hebben veroorzaakt, of dat een indirecte invloed van de organische stof in de grond, via de plant op de aaltjesontwikkeling in het spel was (vgl. VAN DER LAAN, 1956).

op de aaltjes parasiteren. Dat deze detritus-eters ook wel eens nematoden naar binnen krijgen, lijdt voor mij geen twijfel. Welke factoren dan wel het achteruitgaan van populaties van parasitaire aaltjes bij aanwezigheid van Enchytraeïden bepalen, is evenwel nog onbekend.

Van meer belang voor ons onderzoek kunnen zijn de schimmels, die *Heterodera*-cysten binnendringen en de eieren aantasten. In de loop der jaren zijn verschillende soorten bekend geworden, voornamelijk gevonden in de cysten van het bietecystenaaltje (*H. schachtii*). De oudste berichten zijn afkomstig van KORAB (gerefereerd door GOFFART, 1932). In Zuid-Rusland vond KORAB sterke parasitering van de cysten van het bovengenoemde aaltje, tot 80% toe; de onderzoekingen zouden berusten op 250.000 cysten. De belangrijkste parasiet was *Torula heteroderae* JACQ., thans *Phialophora heteroderae* (JACQ.) VAN BEYMA geheten. Deze doodt de larven en de eieren en kleurt de cyste-inhoud roodbruin. Later vond ROZSYPAL (1934) in Tsjechoslowakije bij een onderzoek van 25.000 cysten ook verscheidene schimmelsoorten, vooral *Trichosporium populneum* L. et F. De stam van deze schimmel, afkomstig van ROZSYPAL, werd door VAN BEYMA THOE KINGMA (1937) identiek bevonden met *Phialophora heteroderae*. Het lag dus voor de hand aan deze *Phialophora* bij ons onderzoek in de eerste plaats aandacht te schenken.

Ook de schimmel *Isaria destructor* wordt telkens genoemd als parasiet van de cyste-inhoud (BAUNACKE, 1923; RADEMACHER & SCHMITT, 1933). Deze soort is identiek met *Metarrhizium anisopliae* SOROKIN, die reeds sinds 75 jaar één der meest geliefde objecten is voor het onderzoek naar de biologische bestrijding van insekten in de warmere streken (vgl. FRIEDERICHS, 1920). Het onderzoek aan deze schimmel (de „green muscardine") gaat terug tot METSCHNIKOFF in 1879 (vgl. SCHOEVERS, 1916). In 1884 richtten Russische groot-grondbezitters reeds een fabriek op, waar deze schimmel op rijst werd gekweekt. De fabriek leverde sporensuspensies af, die tegen de larven van de bietesnuitkever in de suikerbietenvelden werden gebruikt. Ook op andere plaatsen ter wereld (Trinidad o.a.) heeft men op grote schaal onderzoek met deze schimmel gedaan, maar ten slotte heeft men deze methode van bestrijding opgegeven, waarschijnlijk ook, omdat sindsdien de chemische bestrijding naar voren kwam. *M. anisopliae* heeft talrijke gastheren, doch volgens FRIEDERICHS moet het insekt tevoren verzwakt zijn, voordat van aantasting sprake is. In Duitsland, noordelijker gelegen dan de andere vindplaatsen, trof hij deze schimmel niet aan. Dat deze parasitaire schimmel, vijand van talrijke insektesoorten, ook de cyste-inhoud der aaltjes aantast, lijkt waarschijnlijk.

Behalve *Phialophora* en *Metarrhizium* zijn er nog opgaven van enige andere schimmels, die in de cysten zijn aangetroffen, o.a. ook soorten van het bekende geslacht van insektenaantastende schimmels *Entomophthora*. Verder wil ik hier nog één soort noemen, nl. *Cylindrocarpon radicicola*. Deze schimmel is echter tevens bekend als planteparasiet. GOFFART (1932) vond *Cylindrocarpon* herhaaldelijk in cystenmateriaal, dat lang bewaard was.

Andere micro-organismen, die aaltjes aantasten, zijn verscheidene malen beschreven. Bij DOLLFUS kunnen wij er vele vinden. Het zijn echter alle min of meer incidentele vondsten, niet speciaal aan cystenaaltjes, en hun betekenis voor de biologische bestrijding is twijfelachtig. Zo beschreef THORNE (1940) de Sporozoe *Duboscquia penetrans* als een specifieke parasiet van het weideaaltje (*Pratylenchus pratensis* DE MAN). Protisten of bacteriën, die de cyste-inhoud aantasten, zijn echter tot nu toe niet bekend geworden.

Ten slotte moeten wij hier spreken over de aaltjesvangende amoebe (WEBER, ZWILLENBERG & VAN DER LAAN, 1952; ZWILLENBERG, 1953; VAN DER LAAN, 1954), thans beschreven als *Theratromyxa weberi* ZWILLENB. Dit organisme is zeer actief in het verslinden van grote hoeveelheden larven van het aardappelcystenaaltje. Het is in de vrije natuur tweemaal gevonden, beide malen in cysten van *H. rostochiensis* uit zandgrond (Ter Apel en Noordwijk).[1]) Waarschijnlijk is het een parasiet van vrijlevende aaltjes in de grond, die af en toe ook wel eens een cyste binnendringt. Tevens valt het de larven van *Heterodera*-soorten aan. Voor de bestrijding van het aardappelcystenaaltje in de praktijk is het evenwel van weinig betekenis.

2. *a. De oorsprong van de schimmels, die cysten kunnen aantasten*

In ons onderzoek hebben wij ons beperkt tot schimmels, die de cyste-inhoud aantasten. Enkele soorten waren bekend, zoals boven besproken is. Andere hebben wij geïsoleerd uit cysten van *Heterodera rostochiensis*, die afkomstig waren uit verschillende delen van Nederland en Engeland, als ook van de Kanaaleilanden.[2])

Het onderzoek kwam in een nieuwe fase, toen bleek, dat het aardappelcystenaaltje oorspronkelijk afkomstig moet zijn geweest uit Zuid-Amerika (WILLE & BAZAN DE SEGURA, 1952). Daar men bij het onderzoek naar natuurlijke vijanden deze steeds moet zoeken in het land van oorsprong, werd dan ook onmiddellijk bij mijn onderzoek aan materiaal van *H. rostochiensis*, afkomstig van Peru,[3]) voorrang gegeven. Uit deze „Peruviaanse" cysten werd een groot aantal schimmels geïsoleerd, waarvan enige meer dan 10-maal. Naast vele, kennelijk saprofytisch levende fungi, werden er enkele gevonden, die nader onderzoek waard leken. Het Centraal Bureau voor Schimmelcultures verleende zijn bemiddeling bij de determinatie, waarbij bleek, dat enkele schimmels mycologisch van belang waren (STOLK, 1954).

Op deze wijze werd een reeks schimmelstammen verkregen, die mogelijk parasitair waren tegen het aardappelcystenaaltje. Of ze werkelijk de cyste-inhoud aantastten, moest echter nader worden onderzocht.

Een cyste is een nematode-wijfje, dat afgestorven is en waarin naast de levende eieren tevens de resten van de organen van het wijfje nog aanwezig zijn. De cyste heeft twee openingen, de oorspronkelijke mondopening en de vulva van het wijfje; steriel is dus de cyste-inhoud allerminst en de kans, naast parasitaire schimmels ook saprofyten te isoleren, is groot.

2. *b. De gebruikte schimmelsoorten*

Voor het isoleren van de parasitaire schimmels was het nodig, de cysten gedurende een bepaalde tijd onder te dompelen in een desinfectans en ze daarna te enten op een steriele agarbuis. Verschenen er dan na verloop van enige weken geen schimmels of bacteriën, dan kon men aannemen, dat de cyste, althans uitwendig, ontsmet was. Na enige proevenseries met sublimaat, waterstofperoxyde

[1]) Eind 1955 is deze of een dergelijke amoebe ook in Engeland, bij Cambridge gevonden, naar Mr. T. D. WILLIAMS mij meedeelde. Kort daarop trof Dr. R. D. WINSLOW een dergelijk organisme aan als parasiet van het bietecystenaaltje (*H. schachtii*) bij Sarnia, Ontario, Canada.

[2]) Gaarne zeg ik hierbij Prof. B. G. PETERS, destijds Rothamsted Experimental Station, hartelijk dank voor zijn medewerking.

[3]) Senora Ing. C. BAZAN DE SEGURA dank ik hierbij gaarne voor het ter beschikking stellen van materiaal.

en alcohol, bleek een onderdompeling gedurende een tot twee minuten in 75% alcohol het beste resultaat te geven. Als men voorts aldus behandelde cysten in aardappelwortelsecreet legt, blijken de larven er normaal uit te komen; de inhoud is dus niet beschadigd door de behandeling.

Vervolgens werd een aantal cysten geïnfecteerd met een parasitaire schimmel (*Phialophora heteroderae*). Daartoe ontsmetten wij de cysten op bovenbeschreven wijze en entten ze op agarbuizen met een *Phialophora*-cultuur. Na drie tot vier weken werden de cysten er uit gehaald, weer oppervlakkig ontsmet en in een schone agarbuis gebracht. Dan bleek *Phialophora* er weer uit te voorschijn te komen. Pas na drie minuten dompelen in alcohol bleken de *Phialophora*-sporen gedood te zijn. Parasitaire schimmels, die in de cysten zijn binnengedrongen, konden dus op deze wijze geïsoleerd worden.

Ook door observatie van grote hoeveelheden cysten onder de prepareermicroscoop konden parasitaire schimmels worden gevonden. Sommige cysten vertoonden zwarte vlekken. Deze werden afzonderlijk op buizen met kers- en moutagar geënt en van de schimmel, die er het talrijkst uitkwam, werd een reincultuur gemaakt.

Voorts werden honderden cysten na oppervlakkige ontsmetting met alcohol één voor één op buizen geënt. De schimmels, die er vele malen uit groeiden, werden geïsoleerd.

Zo werden ten slotte stammen verkregen, die mogelijk parasitair zijn.

In de regel gebruikte ik jonge cysten, die grotendeels gevuld waren met eieren met levende inhoud. Oudere, reeds half lege cysten zijn namelijk gevuld met allerlei afval, waarop saprofyten welig tieren. Uit dergelijke cysten is het heel moeilijk parasieten te isoleren.

1. Over de pycniden van een *Phoma*, die in cysten van Nederlandse oorsprong geregeld worden aangetroffen (Fig. 1), werd al eerder bericht (VAN DER LAAN, 1953). Sindsdien is deze soort door het Centraal Bureau voor Schimmelcultures (C.B.S.) te Baarn gedetermineerd als *Phoma tuberosa* MELH., ROSENB. & SCHULTZ. Een onderzoek naar cysten, verzameld in verschillende delen van Nederland, wees uit, dat de aantasting nooit meer dan 5% bedroeg, zodat deze inheemse parasiet blijkbaar niet zeer belangrijk is.
2. Andere cysten van Nederlandse oorsprong vertonen vele, kleine zwarte stippen (Fig. 2). Hiervan isoleerden wij de schimmel *Colletotrichum atramentarium* (BERK. et BR.) TAUB., die ook wel aardappels aantast. Deze schimmel is nauwelijks als parasiet aan te merken.
3. Regelmatig isoleerden wij uit Nederlandse cysten de schimmel *Monotospora daleae* MASON, een vrij algemene bodemschimmel, die in het oog valt door de typische aleurio-sporen (Fig. 5). Blijkbaar komt deze schimmel ook in Denemarken in de cysten voor, daar Dr. P. BOVIEN mij in 1953 een preparaat van een cyste met deze schimmel toonde.
4. Een aantal schimmels werd geïsoleerd uit een partij cysten, ontvangen uit Engeland. Van enig belang is wellicht *Pseudeurotium ovalis* STOLK, die uit materiaal van het eiland Jersey te voorschijn kwam. Deze schimmel vormt zeer duidelijk herkenbare vruchtlichamen met ronde asci (Fig. 6).
5. Eveneens uit Engels materiaal werd geïsoleerd de gele *Penicillium vermiculatum* DANGEARD, een algemene, ook hier voorkomende soort, die mogelijk ook als parasiet fungeert.

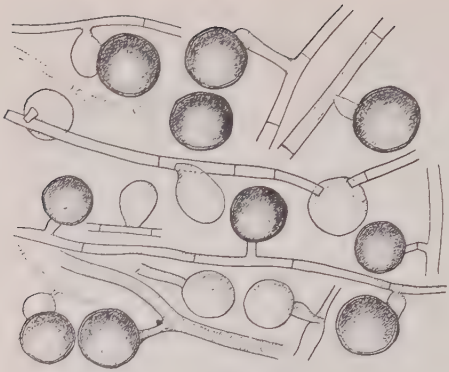


Fig. 5

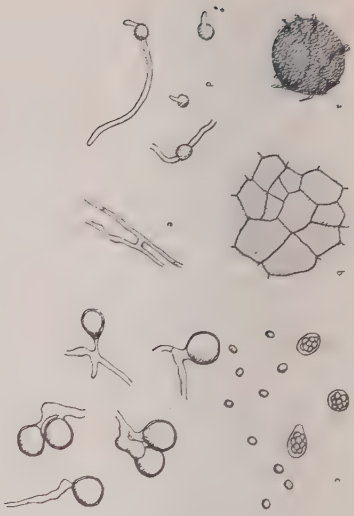


Fig. 7

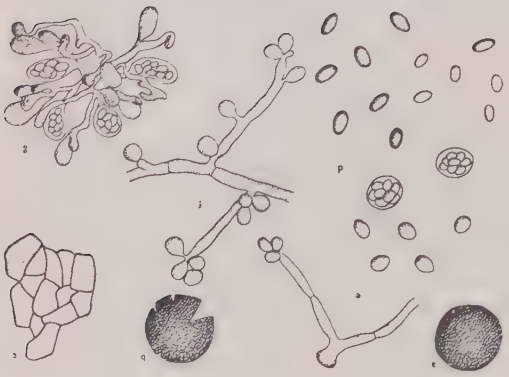


Fig. 6

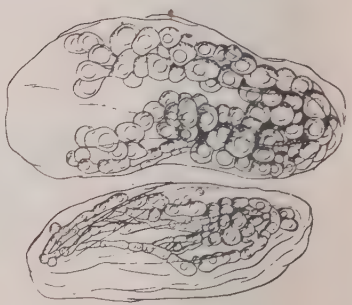


Fig. 8

FIG. 5. *Monotospora daleae*, aleuriosporen aan de hyfen (naar MASON, 1933).
Monotospora daleae, hyphae with aleuriospores (*after* MASON, 1933).

FIG. 6. *Pseudeurotium ovalis*, peritheciën, asci en ascosporen (naar STOLK, 1955).
Pseudeurotium ovalis, perithecia, asci and ascospores (*after* STOLK, 1955).

FIG. 7. *Anixiopsis stercoraria*, peritheciën, asci en ascosporen (naar STOLK, 1955).
Anixiopsis stercoraria, perithecia, asci and ascospores (*after* STOLK, 1955).

FIG. 8. Eieren van *Heterodera schachtii*, aangetast door *Phialophora heteroderae* (naar ROZSYPAL, 1934).
Eggs of Heterodera schachtii, affected by P. heteroderae (*after* ROZSYPAL, 1934).

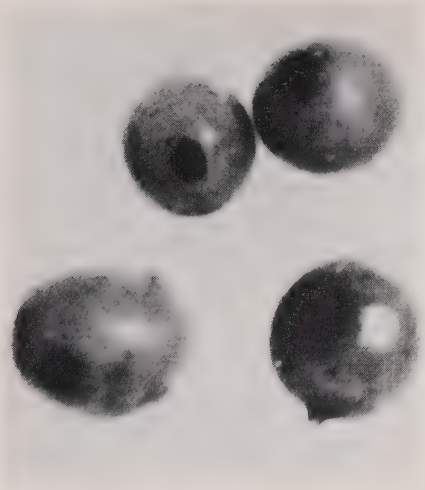


Fig. 1

Cysten met pycniden van *Phoma tuberosa*.

Cysts with pycnids of Phoma tuberosa.

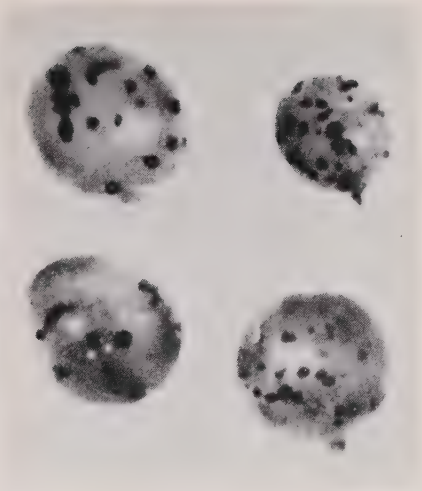


Fig. 2

Cysten met sklerotiën van *Colletotrichum atramentarium*.

Cysts with sclerotia of Colletotrichum atramentarium.

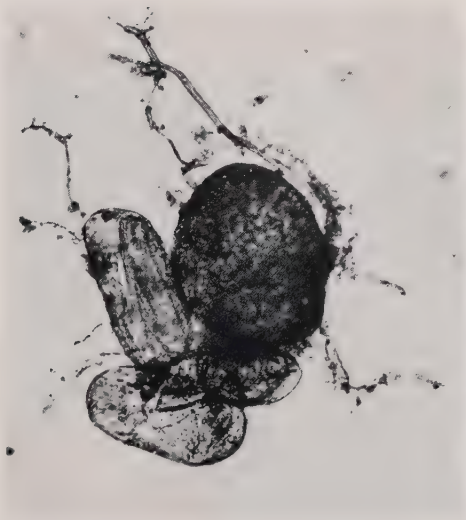


Fig. 3

Een vruchtlichaam van *Anixiopsis stercoraria* tussen eieren van *Heterodera rostochiensis*.

A fruitbody of Anixiopsis stercoraria between eggs of Heterodera rostochiensis.

Fig. 4

Ei van *Heterodera rostochiensis* in het mycelium van *Phialophora heteroderae*.

An egg of H. rostochiensis in the mycelium of P. heteroderae.

Fig. 9

Fig. 10

Aantasting van eieren van *Heterodera rostochiensis* door *Phialophora heteroderae*. *Eggs of Heterodera rostochiensis affected by P. heteroderae.*

FIG. 9. Begin der aantasting.
Beginning of attack.

FIG. 10. De schimmel is het ei binnengedrongen en zuigt de larve uit.
The fungus has penetrated the egg and is sucking the larva.

FIG. 11. De uitgezogen larve-huid blijft achter.
The empty cuticle of the larva is left.

Fig. 11

Fig. 12

FIG. 12. Hyphen en rustmycelium van *Cylindrocarpon radicicola* op eieren van *Heterodera rostochiensis*. De schimmel dringt het ei niet binnen.
Hyphae and resting mycelium of Cylindrocarpon radicicola on eggs of Heterodera tochiensis. This fungus does not penetrate the egg.

6. Een groot aantal schimmelstammen werd uit Peruviaanse cysten geïsoleerd. Uit een oogpunt van parasitaire activiteit was verreweg de belangrijkste de soort *Anixiopsis stercoraria* HANSEN (vgl. ook STOLK l.c.), een zeer typische Ascomyceet met bolvormige peritheciën en ronde asci (Fig. 3 en 7). Van deze schimmel kon, zoals hierachter volgt, aangetoond worden, dat hij actief de cysten binnendringt.
7. Een zwarte, vrij langzaam groeiende schimmel, waarvan de sporen verwantschap toonden met *Phialophora*, werd door het C.B.S. gedetermineerd als *Margarinomyces heteromorpha* MANGENOT. Ook deze is uit Peru afkomstig en waarschijnlijk parasitair.
8. Een derde schimmel, uit het Peruviaanse materiaal verkregen, is verwant aan *Penicillium* en door het C.B.S. voorlopig in het geslacht *Scrophulariopsis* geplaatst. In dit artikel wordt hij onder deze naam aangeduid.
9. Een stam van *Phialophora heteroderae* (JACQ.) VAN BEYMA, werd van het C.B.S. ontvangen. (Fig. 4 en 8–11)
10. Van *Metarrhizium anisopliae* SOROKIN werd een drietal stammen van het C.B.S. verkregen.
11. Ook *Cylindrocarpon radicicola* WOLLENW. werd uit de collectie van het C.B.S. betrokken. (Fig. 12)

3. METHODIEK

Om nu te bepalen of deze schimmelstammen werkelijk parasitair op het aardappelcystenaaltje waren, gingen we als volgt te werk. Een 50-tal uitgezochte cysten, die levende inhoud hadden, werden gedurende 1–2 minuten in alcohol 75% ontsmet en geplaatst in een 3 weken oude cultuur van de schimmel in buizen. Na 6–8 weken bewaard te zijn in een thermostaat bij 25°C werden de cysten eruit gehaald en op vitaliteit onderzocht. Aanvankelijk werden er lokproeven mee genomen, d.w.z. de cysten werden in aardappelwortelsecreet gelegd en het aantal uitkomende larven werd gedurende 6–8 weken geteld. Later bleek de fluorescentie-kleurmethode (VAN DER LAAN & BIJLOO, 1954) uitstekend te gebruiken. In de laatste tijd is ook deze methode verlaten en vervangen door de homogenisatormethode (BIJLOO, 1954). Uit de volgende cijfers blijkt de volkomen vergelijkbaarheid tussen beide methoden (Tabel 1).

TABEL 1. Vergelijkende bepalingen van de vitaliteit van de cyste-inhoud van *Heterodera rostochiensis*.
Comparative determination of the viability of the cyst contents of Heterodera rostochiensis.

Monster *Sample*	Methode *Method*	Percentage eieren *Percentage of eggs*			Percentage larven *Percentage of larvae*
		levend *living*	leeg *empty*	dood *dead*	
I	Homogenisator *Homogenizer*	25,3	47,5	24,6	2,6
I	Fluorescentie *Fluorescence*	25,5	48,0	25,0	1,5
II	Homogenisator *Homogenizer*	32,3	47,7	19,7	0,3
II	Fluorescentie *Fluorescence*	30,7	50,8	18,2	0,3

Tevens werd de inhoud van een aantal cysten microscopisch onderzocht en werden preparaten van aangetaste eieren gemaakt (Fig. 9–12).

Dit onderzoek bleek helaas niet altijd een indruk te geven van de parasitaire eigenschappen der schimmels, daar het optreden van schimmelziekten in hoge mate afhankelijk is van de omstandigheden. Zo werkt vochtigheid het optreden zeer in de hand. Tevens verzwakken vochtigheid en hoge temperatuur de vitaliteit der cysten. Een behandeling gedurende 6–8 weken bij 25°C in de agarbuizen is dus uitermate gunstig voor de schimmel. Ook zwakte-parasieten krijgen hier hun kans. Een en ander bleek uit het hoge percentage dode en verschimmelde cysten, dat steeds weer in de blanco-serie optrad. Het was daarom noodzakelijk deze proeven in grond uit te voeren. Daartoe werden potten gevuld met 500 cysten gemengd in zand- of kleigrond. Vervolgens werd de inhoud van erlenmeyers van 300 ml met schudcultures van de te onderzoeken schimmel door de grond gemengd. Er werd een grondbedekking aangebracht en de grond werd natgehouden.

Na 6 maanden werden de cysten door opspoelen met de Fenwick-kan uit de grond geïsoleerd en werd nagegaan of de schimmel binnengedrongen was. De cysten werden daartoe na oppervlakkige ontsmetting afzonderlijk op agarbuizen geënt. Tevens werden met de cysten lokproeven ingezet, terwijl ook met de kleurmethode een eventuele achteruitgang van de vitaliteit ten opzichte van de blanco's werd nagegaan.

4. AARD VAN HET PARASITISME DER SCHIMMELS

Onderzocht werd of de schimmels een stof afscheidden, die giftig is voor de aaltjes. Van *Phialophora heteroderae*, *Metarrhizium anosopliae* en *Cylindrocarpon radicicola* werden cultures in vloeibare voedingsoplossing (volgens CZAPEK) ingezet. Nadat de schimmels goed gegroeid waren, werden de cultures door een bacteriekaars gefiltreerd. De filtraten werden door Ir. J. D. BIJLOO onderzocht op nematicide werking. Geen enkele giftige werking werd geconstateerd.

Vervolgens werd de inhoud van cysten, die kort tevoren geïnfecteerd waren met *Phialophora heteroderae*, microscopisch onderzocht. De meeste eieren vertoonden hyfen van de schimmel aan het oppervlak. Door een speciale kleuring[1]) gelukte het de loop der hyfen te vervolgen. Het bleek, dat zij in sommige gevallen door de eiwand heen geboord waren; de hyfen waren zichtbaar binnen de eischaal, in de met voedingsvloeistof gevulde ruimte tussen de eiwand en de larve van het aaltje. Aantasting van het aaltje zelf werd niet geobserveerd (Fig. 9, 10 en 11).

In een later stadium werden vele eieren aangetroffen, die er verdroogd uitzagen. De larven in het ei waren nog aanwezig, maar verschrompeld. Blijkbaar voeden deze schimmels zich van de ei-inhoud, die de larve omgeeft, zonder het aaltje zelf aan te tasten, hetgeen echter toch de dood van de larve ten gevolge heeft. Dikwijls kon echter worden waargenomen, dat slechts een deel der eieren aldus was gedood, terwijl de rest wel hyfen aan het oppervlak vertoonde, doch duidelijk intact was gebleven. Soms werden in de cysten ook vruchtlichamen der schimmel aangetroffen, o.a. de pycniden van *Phoma tuberosa* en de peritheciën van *Anixiopsis stercoraria* (Fig. 3).

[1]) 2 ml van een ½% oplossing van waterblauw met 10 ml van een verzadigde picrinezuuroplossing; 24 uur koud kleuren; monteren in glycerine met glyceel.

5. RESULTATEN DER INFECTIEPROEVEN

1. Cultures van de schimmels werden ingezet op vloeibare voedingsbodem (volgens CZAPEK). Nadat de kolven goed volgegroeid waren, werden per kolf 20–30 cysten toegevoegd. Na 41 dagen, steeds bij 21°C, werden de cysten eruit gehaald en werd er een lokproef mee ingezet, d.w.z. ze werden in schaaltjes met aardappelwortelsecreet gelegd en het aantal uitgekomen larven werd wekelijks geteld. Dit duurde 4 weken. De uitkomst is in Tabel 2 weergegeven.

TABEL 2. Infectieproeven met schimmels op cysten op vloeibare voedingsbodem.
Infections of cysts with fungi in liquid nutrient medium.

	Serie	Aantal cysten *Number of cysts*	Aantal gelokte larven per cyste *Number of hatched larvae per cyst*		Serie	Aantal cysten *Number of cysts*	Aantal gelokte larven per cyste *Number of hatched larvae per cyst*
Phialophora	I	22	23	*Cylindrocarpon*	I	13	450
„	II	22	8	*Monotospora*	I	18	0,5
„	III	30	10	*Arthrobotrys*	I	12	110
Metarrhizium	I	18	525	„	II	17	125
„	II	18	450	„	III	17	120

Deze uitkomst is zeer merkwaardig: *Metarrhizium* en *Cylindrocarpon* hebben de cysten niet aangetast, want zeer veel larven zijn uitgekomen. *Arthrobotrys*, een schimmel, die de cyste niet binnendringt, zoals tevoren microscopisch was onderzocht, diende als controle. Doch het aantal aaltjes, dat gelokt werd, was hier veel lager.

Nu is hier een complicatie in het spel: De schimmels vormden een dik vlies op de vloeistof, waarop de cysten lagen. Slechts bij *Arthrobotrys* was dit niet het geval, zodat daar de cysten gedurende 41 dagen bij 21°C onder water lagen. De vitaliteit gaat als gevolg daarvan achteruit. Deze proef geeft een aanwijzing, dat *Phialophora* en *Monotospora* onder deze omstandigheden parasitair zijn, *Metarrhizium* en *Cylindrocarpon* niet.

Wegens de complicatie van de achteruitgang van de vitaliteit werd deze methode daarna verlaten.

2. De schimmels werden geënt op cultuurbuizen; na een maand werden de cysten er in gebracht. Weer 6–8 weken later werden de cysten er uitgehaald. De vitaliteit van de cyste-inhoud werd bepaald met de fluorescentie-methode (VAN DER LAAN & BIJLOO, 1955) (Tabel 3).

Deze cijfers geven wel enige aanwijzingen, maar van een bijzonder sterke parasitaire werkzaamheid is bij geen van deze schimmels sprake. Nergens werd meer dan 50% van de inhoud gedood. Daar wij uiteindelijk toch geen goed beeld verkregen, omdat de omstandigheden in deze proeven niet vergelijkbaar zijn met die in de grond, werd ook deze methode verlaten.

TABEL 3. Infectieproeven met schimmels op cysten in cultuurbuizen.
Infections of cysts with fungi in agar tubes.

Naam schimmel *Name fungus*	Percentage dode eieren in de cysten *Percentage killed eggs in cysts, determined by fluorescent staining* Herhalingen *(replications)* 1	2	3	4	5	6	Gemiddelde *Mean*	Parasitaire werking *Parasitic activity*
Arthrobotrys oligospora (standaard)[1]) (*standard*)[1])	13	10	14	13	15	12	13	—
Dactylella sp. (standaard)[1]) (*standard*)[1])	8	14	14	15			13	—
Dactylaria sp. (standaard)[1]) (*standard*)[1])	15	15	9				13	—
Margarinomyces heteromorpha	16	9	7				11	—
Scrophulariopsis sp.	33	18	20	15	16		20	+?
Anixiopsis stercoraria	19	20	18	18			19	+?
Colletotrichum atramentarium	15	15					15	—
Monotospora daleae	10	12	27	20			?	?
Phoma tuberosa	10	13	17	14			13	—
Pseudeurotium ovalis	47	53	40	36	56	65	50	++
Penicillium vermiculatum	46	27	24	26	26		30	+
Phialophora heteroderae	23	18	34	31			26	+
Metarrhizium anisopliae	17	17	22	20	40	36	?	?
Cylindrocarpon radicicola	43	43	16	13	26	25	?	?

[1]) Deze schimmel dringt de cysten niet binnen. *This fungus does not penetrate the cysts*

3. Schimmels werden gebracht in een aantal potten, die met cysten besmette zandgrond bevatten. De inhoud van telkens drie cultuurbuizen werd daartoe met water gemengd in de Waring Blendor fijngemalen en in een pot met 2600 gram grond gebracht. Daarna bleven de potten staan in een ongestookte kas van september–februari (5 maanden). Gedurende deze tijd werden ze regelmatig begoten. De cysten werden toen door opspoelen uit een deel der pot-inhoud geïsoleerd, gedurende 1–2 minuten oppervlakkig ontmet in 75% alcohol en op cultuurbuizen met kersagar geënt, telkens één per buis. De rest van de pot-inhoud werd bezaaid met een grondbedekker en bleef tot september staan (12 maanden). Als de infectie in de grond geslaagd is, moeten de parasitaire schimmels uit de cysten te voorschijn komen (Tabel 4).

TABEL 4. Potproeven, waarin parasitaire schimmels aan grond met cysten werden toegevoegd. Uit elke pot werden 20 cysten op buizen met kersagar geënt.
Pot experiments in which parasitic fungi were added to soil mixed with cysts. Twenty cysts from each pot were incubated on tubes with cherry agar.

Naam van de schimmel *Name of fungus*	Aantal geslaagde herisolaties *Number of successful re-isolations*	
	na 5 maanden *after 5 months*	na 12 maanden *after 12 months*
Arthrobotrys oligospora (standaard, *standard*)	0	0
Margarinomyces heteromorpha	2	5
Scrophulariopsis sp.	1	1
Anixiopsis stercoraria	4	4

Een herhaling op grotere schaal van deze proef had plaats in de zomer van 1954. Bovendien werden toen twee series potten genomen, nl. één met zandgrond en één met kleigrond. Telkens werd de inhoud van 4 buizen met een der schimmels door de inhoud van de pot à 1 kg gemengd. De proef duurde van 26 mei–26 november, dus 6 maanden. Daarna werden de cysten door opspoelen uit de potten geïsoleerd. Van een deel dezer cysten werd de vitaliteit bepaald met de fluorescentie-methodiek (Tabel 5).

TABEL 5. Soortgelijke proef als in Tabel 4 weergegeven. Vitaliteitsbepalingen van de cysteinhoud met de fluorescentiemethode.
Similar experiment as represented in Table 4. Determination of viability of cyst contents with the fluorescence method.

Herhalingen *Replications* ——→ / Naam schimmel *Name of fungus*	Zandgrond *Sandy soil* Percentage dode eieren *Percentage killed eggs* I	II	Parasitaire werking *Parasitic activity*	Kleigrond *Clay soil* Percentage dode eieren *Percentage killed eggs* I	II	Parasitaire werking *Parasitic activity*
Arthrobotrys oligospora (standaard, *standard*)	15	10	—	20	15	—
Margarinomyces heteromorpha	16	7	—	27	34	+
Scrophulariopsis sp.	13	7	—	17	13	—
Anixiopsis stercoraria	30	36	++	23	30	+
Colletrotrichum atramentarium	21	26	+	14	17	—
Monotospora daleae	18	20	?	19	15	—
Phoma tuberosa	18	13	—			
Pseudeurotium ovalis	16	20	?	16	12	—
Phialophora heteroderae	49	51	++	24	26	+
Mengsels van bovengenoemde schimmels *Mixture of above fungi*	24	23	+	24	24	?

Voorts werd een ander deel van de cysten uit dezelfde proef op buizen kersagar geënt, na op de gebruikelijke wijze oppervlakkig ontsmet te zijn. In Tabel 6 wordt het aantal herisolaties der schimmels vermeld. Steeds werden per pot 20 cysten afzonderlijk op buizen geënt.

TABEL 6. Dezelfde proefserie als weergegeven in Tabel 5.
Same series of experiments as represented in Table 5.

Naam van de schimmel *Name of fungus*	Aantal geslaagde herisolaties uit 20 cysten *Number of successful re-isolations from 20 cysts*	
	zand *sandy soil*	klei *clay soil*
Arthrobotrys oligospora	0	0
Margarinomyces heteromorpha	0	0
Scrophulariopsis sp.	0	2
Anixiopsis stercoraria	7	5
Colletotrichum atramentarium	0	0
Monotospora daleae	1	0
Pseudeurotium ovalis	0	0
Phialophora heteroderae	0	0

In het voorjaar van 1955, dus een jaar na het begin van de laatst vermelde proef, werd een viertal potten nog eens onderzocht. Uit elke pot werden 2 × 100 cysten geïsoleerd en hieruit werden gedurende 6 weken de larven in aardappelwortelsecreet gelokt (Tabel 7).

TABEL 7. Dezelfde proefserie als weergegeven in Tabellen 5 en 6. Totaal aantal uitgelokte larven per cyste.
Same series of experiments as represented in Tables 5 and 6. Total number of hatched larvae per cyst.

	I	II
Anixiopsis – zandgrond *sandy soil*	122	145
Colletotrichum – zandgrond *sandy soil*	166	170
Anixiopsis – kleigrond *clay soil*	99	86
Colletotrichum – kleigrond *clay soil*	89	95

De behandeling met *Anixiopsis* schijnt in deze potproef in zandgrond vermindering van de levende inhoud van de cyste te geven, in kleigrond niet. Voorts wordt hier weer eens bevestigd, dat de cysten, die in kleigrond zitten, een minder groot aantal larven per cyste bevatten, dan die, welke onder gelijke omstandigheden in zandgrond verkeren.

In een potproef, in 1955 genomen, werd de grond van de helft van de potten besmet met een mengsel van 7 verschillende schimmels. Dit waren: *Anixiopsis stercoraria*, *Scrophulariopsis* sp. *Margarinomyces heteromorpha*, *Monotospora daleae*, *Phoma tuberosa*, *Pseudeurotium ovalis* en *Phialophora heteroderae*. Er waren drie series potten, nl. met stalmest (S)-, compost (C)- en kunstmest (K)-bemesting en elke serie bevatte voor de helft parasitaire schimmels (het reeds bovengenoemde zevental). De series bestonden elk uit 12 potten met schimmels (S +, C + en K +) en 12 potten zonder schimmels S –, C –, K –). Elke pot bevatte 2000 gram zandgrond die 253 cysten per 100 gram bevatte. Per pot werd 250 ml „schimmelbrij" toegediend, een mengsel van schimmels, voedingsbodems (rijst-, kers-, mout-, en havermoutagar) en water. De potten zonder schimmels kregen slechts hetzelfde volume water toegediend. Per pot werd een aardappel geplant.

Toen de planten 26 dagen oud waren, werden van elke serie 2 × 7 planten geoogst, d.w.z. het volledige wortelstelsel werd per pot gewonnen, ontdaan van knolletjes en stolonen, oppervlakkig gedroogd, gewogen, in kleine stukjes geknipt en in de Waring Blendor gemalen. De suspensie van worteldeeltjes, waaruit de in de wortels aanwezige aaltjeslarven vrij gekomen waren, werd dan verdund tot een bepaald volume en in monsters daarvan werden de aaltjes geteld, onderscheiden naar de stadia hunner ontwikkeling (VAN DER LAAN, 1956).

De uitkomsten van deze tellingen zijn in Tabel 8 vermeld, waar de gemiddelden van telkens 7 planten zijn aangegeven. Op de verschillen, door de bemestingen veroorzaakt, wordt hier niet ingegaan. Wel blijkt hieruit zeer duidelijk, dat bij twee der drie bemestingen een groot verschil in aantallen binnengedrongen aaltjes, zowel omgerekend per gram wortel als in totaal, optreedt. Bij de S + en K + series zijn slechts half zoveel nematoden binnengedrongen als in de respectievelijke – series. Statistisch bleken deze verschillen betrouwbaar. Bij het verschil tussen S + en S – was $P = 0{,}01$, bij dat tussen K + en K – was $P = 0{,}04$.

TABEL 8. Bepaling van aantallen Heterodera-larven per gram wortel van aardappelplanten, geteeld in potten grond, besmet met cysten. S = stalmest, C = compost, K = kunstmest; + = met schimmels, — = zonder schimmels.

Determination of Heterodera larvae per gram of root from potato plants grown in soil infested with cysts. S = farmyard manuring, C = compost, K = artificial fertilizer, + = with predacious fungi, — = without predacious fungi.

Serie no. *No.*	Wortelgewicht in g *Weigt of roots in g*	Heterodera-larven per g wortel *H.larvae per g of root*			tot. aantal larven per plant *total number of larvae per plant*
		stad. 1 *stage 1*	stad. 2 *stage 2*	tot. alle stad. *total all stages*	
S +	21,31	125	157	283	6030
S —	30,73	130	225	355	10909
C +	23,53	213	313	527	12400
C —	20,76	220	285	505	10483
K +	23,13	92	40	132	3053
K —	24,91	202	82	284	7074

Een aantal potten bleef staan, totdat de aardappelplanten afgestorven waren. Daarna werden uit 3 potten van elke serie twee monsters van 100 gram grond genomen en het aantal cysten erin bepaald. In Tabel 9 is de uitkomst, het gemiddelde van elke serie, vermeld.

TABEL 9. Aantal cysten per 100 g grond; dezelfde proef als in Tabel 8.

Number of cysts per 100 g of soil; same experiment as in Table 8.

	S +	S —	C +	C —	K +	K —
Voor de proef *Before the experiment*	253	253	253	253	253	253
Na de proef *After the experiment*	1306	1754	816	1533	1517	1899

Het aantal cysten in de + series, waaraan dus schimmels zijn toegevoegd, is in alle series geringer dan in de – series. Hoewel uit slechts 3 herhalingen geen statistische verschillen te berekenen zijn, geven deze cijfers wel een aanwijzing, dat in de potten, waar de schimmels aan toegevoegd zijn, de cystenaanwas minder sterk is geweest.

Aan de inhoud van deze cysten werd ten slotte nog met de homogenisatormethode, het percentage dode eieren aan telkens 200 cysten bepaald. De cijfers, wederom gemiddelden van 3 potten, zijn in Tabel 10 vermeld.

TABEL 10. Percentage dode eieren per 200 cysten; dezelfde proef als in Tabellen 8 en 9.

Percentage dead eggs pro 200 cysts; same experiment as in Tables 8 and 9.

S +	S —	C +	C —	K +	K —
34	21	27	18	28	26

Wederom is er een sterke aanwijzing voor een positieve werkzaamheid der toegevoegde schimmels in twee van de drie series.

6. BESPREKING DER RESULTATEN

a. Infectieproeven

Het is duidelijk, dat onder bepaalde omstandigheden sommige schimmels de

cysten binnendringen en een gedeelte van de inhoud doden. Merkwaardig is echter, dat de uitkomsten der verschillende proefreeksen elkaar niet dekken. Zo is bij de infecties in buizen *Pseudeurotium ovalis* bijzonder werkzaam, terwijl *Anixiopsis stercoraria* niet duidelijk pathogeen is geweest. In de infectieproeven in potten is het anders: daar is *Anixiopsis* verreweg het actiefst en *Pseudeurotium* heeft geen aantoonbare infecties teweeggebracht. Dit is wel verklaarbaar: schimmels zijn bijzonder gevoelig voor oecologische omstandigheden: vocht, temperatuur en in de grond zeker ook voor andere micro-organismen (bij de potproeven werd doelbewust niet met steriele grond gewerkt!). Antibiotische werkingen van micro-organismen onderling kunnen optreden, waardoor een bepaalde schimmel niet tot ontwikkeling komt.

Behalve beide genoemde schimmels, waarvan, zoals gemeld, *Anixiopsis* van Peruviaanse herkomst is, en *Pseudeurotium* van de Kanaaleilanden afkomstig is, is een aantal geslaagde infecties opgetreden met (in volgorde van belangrijkheid): *Phialophora heteroderae*, *Penicillium vermiculatum*, *Margarinomyces heteromorpha* en *Scrophulariopsis* spec. Van deze soorten was *Phialophora* reeds lang bekend door de onderzoekingen van KORAB en ROZSYPAL; *P. vermiculatum* is een algemene grondschimmel, terwijl *Margarinomyces* en *Scrophulariopsis* uit Peru afkomstig zijn.

b. Invloed der schimmels op de activiteit der nematoden

Hierover zijn nog slechts aanwijzigingen gevonden. In de proef in 1954 (blz. 310, Tabel 7) was de vitaliteit der cysten in kleigrond in de potten met schimmels lager dan in die zonder schimmels. In zandgrond was geen verschil zichtbaar. In de potproef in 1955, waar bemesting en schimmels gecombineerd werden, geven zowel de bepalingen van het aantal binnengedrongen larven in de wortels (Tabel 8), als de bepalingen der vermeerdering der cysten (Tabel 9) verschillen te zien, die erop wijzen, dat de schimmels actief zijn geweest. Ook de percentage dode eieren in de cysten geven dezelfde verschillen te zien.

Hoewel er dus talrijke aanwijzingen zijn, dat de schimmels de aaltjes inderdaad aantasten, is het moeilijk in dit stadium van onderzoek reeds uitsluitsel te geven over de praktische mogelijkheden van de toepassing dezer schimmels. Het is niet uitgesloten, dat in zwaar door *Heterodera* besmette akkers, geïnfecteerd met deze schimmels, de cysten eerder zullen afsterven. Evenwel zullen slechts proeven, die een aantal jaren de vitaliteit der cysten in de grond vervolgen, hierover uitsluitsel kunnen geven. Zelfs dan is het nog moeilijk, zekerheid te verkrijgen, dat inderdaad de schimmels de vervroegde afsterving hebben veroorzaakt. Hoe houdt men controle-vakken vrij van de schimmels?

Dat de schimmels niet de gehele cyste-inhoud doden, behoeft geen bezwaar te zijn. Het zou van grote betekenis zijn, indien zij de afstervingsperiode, thans voor de cysten van *H. rostochiensis* op 15–20 jaar gesteld, zouden bekorten.

7. SUMMARY

Nematodes have many natural enemies (DOLLFUS, 1946), but few are able to destroy them wholesale. A review of literature gives little hope of successful biological control. Populations of *Meloidogyne* may be reduced by adding nematode trapping fungi (e.g. *Arthrobotrys*) to the soil but, so far, success has been obtained only in pots (DESCHIENS, 1943; LINDFORD, 1938; GORLENKO, 1956).

Cysts are not attacked by these fungi. Enchytrid worms or nematode trapping amoebae (*Theratromyxa*) do not seem very promising. The amoeba occurs rarely in soil and has a slow rate of reproduction. Carnivorous nematodes also increase too slowly.

The author's investigations were directed towards a group of parasitic fungi which hitherto have been neglected. These fungi attack the eggs within the cysts, killing the larvae within. Some of the fungi are already known, the most important being *Phialophora heteroderae*. Certain other fungi were found repeatedly in or on cysts, including *Phoma tuberosa* and *Colletotrichum atramentarium* both of which have also been found on potatoes. *Monotospora daleae* was also found many times. Cysts from Jersey (Channel Islands) contained *Penicillium vermiculatum* and *Pseudeurotium ovalis*, the later being newly described by STOLK (1955) from an isolation prepared by the author.

The finding of *Heterodera rostochiensis* in Peru in 1952 threw new light on the problem. South America is presumed to be the place of origin of this nematode and it would be logical to search for natural enemies there. Cysts of potato root eelworm from Peru contained various fungi, the most important being *Anixiopsis stercoraria*, *Margarinomyces heteromorpha* and *Scrophulariopsis* sp. (Fig. 1–8).

Cysts are easily invaded by fungi via the relatively large openings found at the head and vulva. Parasitized cysts were sectioned and the contents were surveyed. Hyphae of fungi were found on the surface of most eggs (Fig. 9–11), staining revealed that hyphae sometimes penetrated through the egg shell but not through the larval cuticle. Hyphae were visible between egg shell and larva. It was concluded that this space was sucked dry by the fungus. Later stages of infection showed eggs dried out with dead, shrivelled larvae inside, other eggs bore many hyphae on the surface but the contents were unharmed.

Filtrates of cultures of several fungi were tested for nematicidal activity but none was found.

The rate of infection of cysts by fungi was difficult to assess as fungal attack is always very dependent on external conditions. The author placed cysts, previously surface sterilised by dipping for 1–2 minutes in 75% ethyl alcohol, in cultures of fungi in liquid nutrient media (Table 2). He also tried introducing cysts into cultures in agar tubes (Table 3). Other experiments were done with fungi in pots of nematode infested soil (Tables 4–6). Fungi capable of parasitising cysts in agar tubes did not always do so in pots and vice versa. As conditions were so different this result was not surprising.

Data were obtained upon the effect of adding fungi to soil containing cysts. Cysts floated from the soil 6 months later showed lower vitality in hatching tests (Tables 7–10). In a pot experiment in which potatoes were grown, the density of larvae within the roots was lower in pots to which fungi were added. In the same experiment a greater increase in the number of cysts occurred in the control pots without fungus and the number of dead eggs per cyst was lower. It is concluded that fungi attack cyst contents and lower their vitality, but from the author's observations, it cannot be stated whether the application of fungi to infested soil would shorten the period of larval infectivity. Further experiments are necessary over a longer period.

Baunacke, W. – 1923. Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung des Rübennematoden Heterodera schachtii. Arb. Biol. Reichsanst. 11:185–288.
Beyma thoe Kingma, F. H. van – 1937. Beschreibung einiger neuen Pilzarten IV. Z.bl. Bakt. II, 96:427–430.
Bijloo, J. D. – 1954. A new method for estimating the cyst contents of the potatoroot eelworm Heterodera rostochiensis Wollenw. J. Helminth. 27:123–126.
Chitwood, B. G. & B. Oteifa – 1952. Nematodes parasitic in plants. Ann. Rev. Microbiol. 6: 151–184.
Deschiens, R., L. Lamy & E. Vautrin – 1943. Essais pratiques de prophylaxie de l'anguillulose des végétaux par l'emploi d'hyphomycètes prédateurs. C.R. Acad. Sci., Paris 216: 539–541.
Dollfus, R. Ph. – 1946. Parasites des helminthes. Paris, Paul Lechevalier Ed. 481 p.
Drechsler, C. – Some hyphomycetes parasitic on free-living terricolous nematodes. Phytopath. 31:773–802.
Duddington, C. L. – 1954. Nematode-destroying fungi in agricultural soils. Nature 173:500–501.
Friederichs, K. – 1920. Über die Pleophagie des Insektenpilzes Metarrhizium anisopliae (Metsch.) Sor. Z.bl. Bakt. II, 50: 335–356.
Goffart, H. – 1932. Untersuchungen am Hafernematoden Heterodera schachtii Schm. Arb. Biol. Reichsanst. 20:1–28.
Goffart, H. – 1952. Vierzig Jahre Kartoffelnematoden-bekämpfung in Deutschland. Gesunde Pfl. 4: 261–264.
Goodey, T. – 1938. Observations on the destruction of the stem eelworm, Anguillulina dipsaci, by the fungus Arthrobotrys oligospora Fres. J. Helminth. 16: 159–164.
Gorlenko, M. V. – 1956. Predatory fungi and their utilisation in nematode control. Nematologica 1: 147–150.
Hutchinson, S. A. & W. F. Mai – 1954. A study of the efficiency of the catching organs of Dactylaria eudermata Drechsl. in relation to Heterodera rostochiensis in soil. Pl. Dis. Reptr 38: 185–186.
Jegen, G. – 1920. Zur Biologie und Anatomie einiger Enchytraeiden. Viertelj. Schr. Naturf. Ges. Zürich 65: 100–208.
Laan, P. A. van der – 1953. Een schimmel als parasiet van de cyste-inhoud van het aardappelcystenaaltje (Heterodera rostochiensis Wollenw.). T.Pl.ziekten 59: 101–103.
Laan, P. A. van der – 1954. Nader onderzoek over het aaltjesvangende amoeboide organisme Theratromyxa weberi Zwillenberg. T.Pl.ziekten 60: 139–145.
Laan, P. A. van der – 1956. The influence of organic manuring on the development of Heterodera rostochiensis. Nematologica 1: 112–125.
Laan, P. A. van der & J. D. Bijloo – 1955. Bepaling van de vitaliteit van de cyste-inhoud van het aardappelcystenaaltje (Heterodera rostochiensis Wollenw.) door fluorochromeren met acridine orange. T.Pl.ziekten 61: 69–75.
Linford, M. B., F. Yap & J. M. Oliveira – 1938. Reduction of soil populations of the root-knot nematode during decomposition of organic matter. Soil Sci. 45: 127–140.
Marcinowski, K. – 1909. Parasitisch und semiparasitisch an Pflanzen lebende Nematoden. Arb. K. Biol. Anst. Land. Forst. Wiss. 7: 1–192.
Rademacher, B. & O. Schmitt. – 1933. Die bisherigen Erfahrungen in der Bekämpfung des Rübennematoden. Arch. Pfl.bau 10: 237–296.
Rozsypal, J. – 1934. Pilze in cysten von Heterodera schachtii Schmidt aus mährischen Rübenboden. Bull. Acad. Tchecosl. Agric. 10: 413–422.
Schaerffenberg, B. & H. Tendl. – 1951. Untersuchungen über das Verhalten der Enchyträiden gegenüber der Zuckerrüben-nematoden Heterodera schachtii Schm. Z. angew. Entom. 32: 476–488.
Schoevers, T. A. C. – 1916. Iets over bestrijding van schadelijke insecten door zwammen en bacteriën. T.Pl.ziekten 22: 131–202.
Steiner, G. & H. Heinli – 1922. The possibility of control of Heterodera radicicola and other plant injurious nemas by means of predatory nemas, especially by Mononchus papillatus Bastian. J. Wash. Acad. Sci. 12: 367–386.
Stolk, A. C. – 1955. The genera Anixiopsis Hansen and Pseudeurotium van Beyma. Anth. Leeuwenh. 21: 65–79.
Thorne, G. – 1927. The life history, habits and economic importance of some Mononchs. J. agric. Res. 34: 265–286.

Thorne, G. – 1928. Nematodes inhabiting the cysts of the sugarbeet nematode (Heterodera schachtii Schmidt). J. agric. Res. 37: 571–575.
Thorne, G. – 1940. Duboscqia penetrans n. sp. (Sporozoa, Microsporidia, Nosematidae), a parasite of the nematode Pratylenchus pratensis (De Man) Filipjev. Proc. Helminth. Soc. Wash. 7: 51–53.
Weber, A. Ph., L. O. Zwillenberg & P. A. van der Laan. – 1952. A predacious amoeboid organism destroying larvae of the potato root eelworm and other nematodes. Nature 169: 834.
Wille, J. E. & C. Bàzan de Segura. – 1952. La Anguilata dorada, Heterodera rostochiensis, una plaga del cultivo de las papas, recien descubierta en el Peru. Min. Agric. Biol. (Lima) 48: 1–17.
Zwillenberg, L. O. – 1953. Theratromyxa weberi, a new proteomyxeous organism from soil. Anth. Leeuwenh. 19: 101–116.

T. Pl.ziekten 62 (1956): 322–324

KORTE MEDEDELINGEN

OBSERVATION EN HOLLANDE DE LA FORME PARFAITE DU CHAMPIGNON *GLOEOSPORIUM PERENNANS* ZELLER ET CHILDS

Met een samenvatting:
Waarnemingen over het voorkomen van de perfecte vorm van Gloeosporium perennans Zeller en Childs in Nederland

With a summary:
Observations on the occurrence of the perfect stage of Gloeosporium perennans Zeller and Childs in the Netherlands

PAR

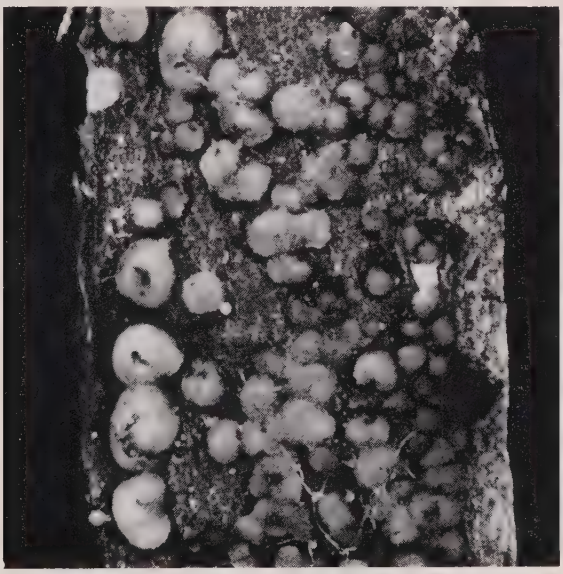
A. BOLAY [1])
Laboratoire de Phytopathologie, Wageningen

La pourriture amère des pommes (Bitterrot) est provoquée en Hollande par deux champignons, connus dans la littérature phytopathologique sous les noms de: *Gloeosporium perennans* ZELLER et CHILDS (= *G. malicorticis* CORDLEY) et *Gloeosporium album* OSTERWALDER. Au cours de ces dernières années, ces deux parasites se sont montrés très actifs (OORT, 1956) et la proportion des fruits dépréciés durant la période de conservation varie entre 5 et 20 %. En certaines occasions, on a même enregistré des pertes allant jusqu'à 50 %. Cette maladie s'attaque également aux arbres, tuant les brindilles et provoquant des chancres sur les branches plus fortes. Après quelques mois, des acervules se développent sur les parties de l'arbre tuées par le champignon.

Le 22 octobre 1956, lors d'un contrôle de quelques vergers de la région comprise entre la Meuse et le Waal (Land van Maas en Waal), nous avons eu l'occasion d'observer sur des chancres formés par *Gloeosporium perennans* les fructifications sexuées de ce parasite, soit la forme *Pezicula malicorticis* (JACKSON) NANNFELDT (= *Neofabraea malicorticis* (CORDLEY) JACKSON). Les apothécies de *P. malicorticis* ont été récoltées sur des pommiers de la variété Golden Delicious dans deux vergers, situés l'un à Druten et l'autre près de Deest. Quelques jours plus tard, nous avons aussi découvert ces apothécies dans le verger du Laboratoire de Phytopathologie, à Wageningen, sur des branches de pommiers de la variété Belle de Boskoop, infectées artificiellement avec du mycélium de *Gloeosporium perennans* en octobre 1955.

Les apothécies apparaissent de préférence sur les gros chancres; mais on peut également en trouver sur des rameaux de faible diamètre (un cm). Elles se forment à la surface des tissus de l'écorce, crevant ou soulevant l'épiderme. Elles peuvent encore se développer sur les tissus du liber, lorsque ceux-ci sont mis à nu, mais nous ne les avons jamais observées sur les tissus du bois. Très souvent, les apothécies se forment à l'emplacement des anciens stromas conidiens. Il

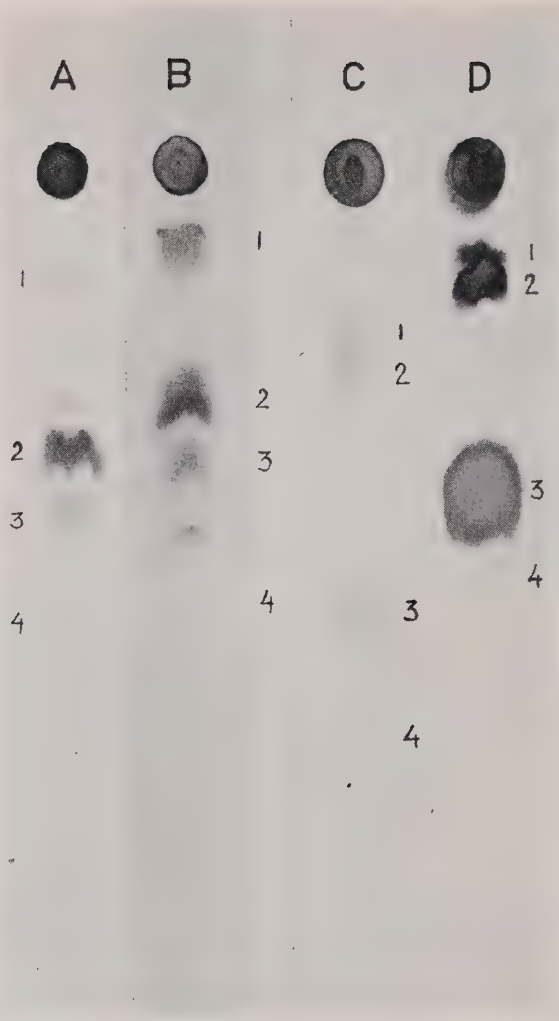
[1]) Ingénieur agronome aux Stations fédérales d'essais agricoles, Lausanne (Suisse).



Groupes d'apothécies de Pezicula malicorticis sur branche de pommier.
Wageningen. Novembre 1956. (Gros. 6x).

Apotheciën van Pezicula malicorticis op appeltak.
Wageningen. November 1956. (Vergr. 6x).

(Foto Lab. Phytopathologie, Wageningen)



A-B. Papierchromatogram van sap uit bladeren van zoete kers, voorkomend op klei.
A. gezond.
B. ringvlekkenziek.

C-D. Monsters verkregen uit bladeren van bomen, voorkomend op zandgrond.
C. gezond.
D. ringvlekkenziek.

A-B. Paper chromatogram of sap from leaves of sweet cherry, growing on clay soil.
A. healthy.
B. infected with ring spot virus.

C-D. Samples obtained from leaves of trees, growing on sandy soil.
C. healthy.
D. infected with ringspot virus.

n'est pas rare de trouver, réunis sur le même stroma, des fructifications sexuées et asexuées.

L'apothécie type est sessile, nettement convexe, de couleur jaune clair en atmosphère humide et tirant sur le brun en vieillissant ou en milieu sec. La fructification mesure 0,4 à 1,6 mm de diamètre. On peut en compter jusqu'à 100 par centimètre carré.

La détermination exacte de l'espèce à laquelle se rapportent les apothécies découvertes dans les vergers hollandais n'est pas encore terminée. Toutefois, nous pensons pouvoir l'identifier à l'espèce *Pezicula malicorticis* (JACKSON) NANNFELDT. Ce parasite, appelé tout d'abord *Neofabraea malicorticis* (CORDLEY) JACKSON, est connu depuis 1913 dans les Etats d'Orégon et de Washington aux Etats-Unis. Dans cette même région, une deuxième espèce, également parasitaire du pommier, a été décrite par KIENHOLZ (1939) sous le nom de *Neofabraea perennans* (ZELLER et CHILDS) KIENHOLZ. De l'avis même de cet auteur, ces deux espèces sont très semblables et ne peuvent pas être distinguées sur la base des caractères morphologiques, tant de la forme conidienne que de la forme parfaite. Seule la longévité des chancres occasionnés par le parasite permet de les différencier. La première espèce ne forme que des chancres annuels, alors que la seconde se maintient plus longtemps et fructifie plusieurs années de suite. On peut se demander si cette faible différence est suffisante pour justifier la création d'une nouvelle espèce. C'est pourquoi nous donnons ici la préférence à l'espèce premièrement décrite.

A la suite des observations de NANNFELDT (1932), le genre *Neofabraea* introduit par JACKSON est identique au genre *Pezicula* qui, plus ancien, a la priorité.

Alors que la forme conidienne du „Bitterrot" est répandue dans la plupart des régions pratiquant l'arboriculture, les fructifications sexuées n'ont été trouvées, à notre connaissance, qu'en Amérique du Nord. Il est fort probable que les conditions météorologiques de l'année 1956, caractérisées par une très forte humidité, aient influencé favorablement la formation des apothécies de *Pezicula malicorticis* dans les vergers hollandais. En effet, d'après KIENHOLZ (1939), des pluies fréquentes et une humidité de l'air élevée et constante sont nécessaires au développement des apothécies.

Seules des observations s'étendant sur plusieurs années permettront de vérifier si la formation des apothécies est occasionnelle en Hollande ou si, au contraire, elle se répète régulièrement chaque année. Dans ce dernier cas, il sera alors important de prèciser le comportement des ascospores en tant que source d'infection.

SAMENVATTING

Op 22 oktober 1956 werd, bij een bezoek aan enkele boomgaarden in het land van Maas en Waal, op kankers van *Gloeosporium perennans*, de perfecte vorm (apotheciën) van deze schimmel gevonden (*Pezicula malicorticis* (JACKSON) NANNFELDT = *Neofabraea malicorticis* (CORDLEY) JACKSON). De apotheciën werden aangetroffen op appelbomen van het ras Golden Delicious in Druten en bij Deest. Enkele dagen later werden ook apotheciën gevonden in de boomgaard van het Laboratorium voor Phytopathologie te Wageningen op bomen van het ras Schone van Boskoop, die in oktober 1955 kunstmatig waren geinfecteerd met mycelium van *G. perennans*. De apotheciën bevonden zich voornamelijk op de grotere kankers; maar zij werden ook aangetroffen op dunne

takjes met een diameter van 1 cm. Zij werden gevormd aan de oppervlakte van de schors en dikwijls ook op de plaats van oude acervuli. De apotheciën zijn zittend, duidelijk convex, heldergeel van kleur bij een vochtige atmosfeer en bruinachtig bij het ouder worden en na opdrogen. De diameter van de apotheciën was 0,4–1,6 mm.

Maximaal werden 100 apotheciën per cm^2 geteld. Waarschijnlijk heeft de natte zomer van 1956 een gunstige invloed op het ontstaan van de apotheciën gehad.

SUMMARY

In October 1956 apothecia, belonging to *Pezicula malicorticis* (Jackson) Nannfeldt (= *Neofabraea malicorticis* (Cordley) Jackson), the perfect stage of the parasite known in plant pathology literature as *Gloeosporium perennans*, have been found on naturally infected appletrees in Druten and near Deest (Land van Maas en Waal) and on appletrees at Wageningen, which had been inoculated with mycelium of *G. perennans* in October 1955. The apothecia occurred as well on the surface of the bark as in old conidial fructifications; they were sessile, clearly convex, bright-yellow under moist conditions and brownish when old or dry. The diameter of the apothecia was 0,4–1,6 mm. As many as 100 apothecia were found on a square cm. It is put forward that the formation of the apothecia has been favoured by the very wet weather of the preceding summer.

LITTERATURE

Kienholz, J. R. – 1939. Comparative study of the apple anthracnose and perennial canker fungi. J. agr. Res. 59: 635–666.

Nannfeldt, J. A. – 1932. Studien über die Morphologie und Systematik der nicht-lichenisierten inoperculaten Discomyceten. Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsala Ser. IV, 8 (2): 90–92.

Oort, A. J. P. – 1956. Gloeosporium-vruchtrot bij appels. Meded. Landb. hogesch. Gent 21: 507–518.

T. Pl.ziekten 62 (1956): 325–326

PAPIERCHROMATOGRAFIE ALS MIDDEL VOOR DE DIAGNOSE VAN DE RINGVLEKKENZIEKTE VAN ZOETE KERS. EEN VOORLOPIGE MEDEDELING

With a summary:
Paper chromatography and diagnosis of ring spot disease in sweet cherry. A preliminary report

DOOR

H. H. ZEYLSTRA

Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (I.P.O.), Wageningen

MULDER (1955) beschreef het voorkomen van de door een virus veroorzaakte ringvlekkenziekte bij zoete kers in Nederland. Dit virus levert in het bijzonder moeilijkheden op, doordat het soms lange tijd duurt (2 tot 3 jaar), eer de besmette bomen symptomen vertonen. Als gevolg hiervan kan het voorkomen, dat het in de kersenteelt gebruikte enthout achteraf toch met dit virus besmet blijkt te zijn geweest, ondanks strenge veldkeuringen van de moederbomen door de N.A.K.-B. Een betrouwbare methode om de ringvlekkenziekte, ook bij afwezigheid van symptomen, te kunnen aantonen, zou dan ook van veel waarde zijn.

Getracht werd de aanwezigheid van het ringvlekkenvirus met behulp van de methode van LINDNER (1948) aan te tonen. Met deze methode zou men, volgens genoemde auteur, verschillende virussen kunnen identificeren aan de hand van de kleur, die na toevoeging van een alkalische kopersulfaatoplossing aan bladmonsters ontstaat. De door ons verkregen verschillen tussen ziek en gezond waren echter niet overtuigend.

De gedachte, waar LINDNER's methode op berust, is, dat in viruszieke bomen, in tegenstelling tot virusvrije bomen, voldoende hoeveelheden van een of meer reducerende stoffen (wellicht polyfenolen) voorkomen om een specifieke reactie te geven. De reactie zou aan betrouwbaarheid winnen, indien het zou gelukken deze stof of stoffen te isoleren.

Om tot deze isolatie te komen, hebben wij van papierchromatografie gebruik gemaakt. Het uitgangsmateriaal voor de chromatogrammen was het sap uit de bladeren. Het uitpersen van de bladeren werd vergemakkelijkt door deze eerst te bevriezen en vervolgens te ontdooien. Na centrifugeren van het verkregen sap, werd hiervan een monster aangebracht op Whatman no. 1 filtreerpapier en gechromatografeerd met een mengsel van 4 vol. n-butanol, 1 vol. ijsazijn en 5 vol. water. Na 48 uur werden de stroken gedroogd en gefixeerd met het gewijzigde ammoniakale zilvernitraatreagens van PARTRIDGE, zoals vermeld door CRAMER (1954).

Bijgaande figuur geeft een voorbeeld van de verschillen in de chromatogrammen, verkregen van monsters van 50 zieke en van 50 op het oog gezonde bomen. Bij vergelijking van zieke (B) en gezonde bomen (A), voorkomend op kleigrond, bleek de eerste vlek op het chromatogram in het eerste geval dichter bij het startpunt te liggen en bovendien donkerder te zijn dan bij het tweede. Donkerder was eveneens de tweede vlek bij zieke bomen. In een aantal gevallen trad in ziek

materiaal tussen de derde en de vierde vlek bovendien een bandje op en in gezond materiaal nog een kleine vlek tussen de eerste en de tweede vlek.

Een ander beeld vertoonden de chromatogrammen van perssap uit bladeren van bomen, die op zandgrond voorkwamen. Bij zieke bomen (D) bleken de eerste drie vlekken duidelijk donkerder gekleurd te zijn dan bij de gezonde (C).

Uit het bovenstaande blijkt, dat er een chromatografisch verschil bestaat tussen duidelijk zieke kersen en op het oog gezonde exemplaren. Hoewel de vergelijking tussen ziek en gezond slechts gemaakt kan worden, indien de bomen op dezelfde grondsoort voorkomen, biedt deze methode perspectieven voor de diagnostiek van de ringvlekkenziekte.

SUMMARY

Sap from leaves of healthy and ring spot diseased cherry trees was chromatographed on Whatman No. 1 filterpaper with n-butanol-acetic acid-water as a solvent. On the dried chromatograms spots became visible after spraying with an ammoniacal solution of silver nitrate. Chromatograms of sap from diseased leaves showed some dark spots. These spots were less pronounced in chromatograms of sap from healthy leaves (see figure). This was the case with material from trees growing on clay soil, as well as from those on sandy soil. Sometimes samples from leaves of diseased trees on clay soil gave chromatograms showing a little band between the spots 3 and 4 (B), and samples from healthy specimens a spot between the spots 1 and 2 (A).

Further studies are needed to answer the question whether the method is suitable for practical use in cherry orchards in order to secure healthy propagation stocks.

LITERATUUR

CRAMER, F., – 1954. Papier Chromatographie. Verlag Chemie G.m.b.H., Weinheim, blz. 69.

LINDNER, R. C., – 1948. A rapid chemical test for some plant virus diseases. Science 107: 17–19.

MULDER, D., – 1955. Het onderzoek van virusziekten van kersen en enkele andere fruitsoorten. Meded. 91 Inst. Pl. ziektenk. Onderz., Wageningen. Tevens in Tuinbouwgids 1955: 488.

BOEKBESPREKING

E. MÜHLE. Rostpilze. Die neue Brehm-Bücherei, Heft 172. Ziemsen Verl., Dld. 1956, 39 blz. met 38 afb. Prijs niet aangegeven, vermoedelijk ong. DM 2.–.

Dit alleraardigste boekje geeft op een populaire, wetenschappelijk geheel verantwoorde wijze een overzicht over de biologie, de systematiek en de bestrijding van de belangrijkste roestzwammen. Ook de fysiologische differentiatie en het onderzoek op roestresistentie worden besproken. O.

VERENIGINGSNIEUWS

Najaarsvergadering

Donderdagmiddag 22 november jl. werd te Utrecht de gebruikelijke najaarsvergadering gehouden. Ruim 100 leden en een tiental introducees toonden hun belangstelling.

Allereerst sprak Ir. J. H. VAN EMDEN, mede namens Ir. R. E. LABRUYÈRE over aardappelschurft. Hij begon met een duidelijk overzicht te geven over hetgeen omtrent deze ziekte uit de literatuur bekend is, om daarna de resultaten van eigen bestrijdingsproeven te bespreken. Hoopvolle resultaten werden daarbij bereikt na een grondbehandeling met sublimaat of pentachloornitrobenzeen. Wel remden beide middelen de ontwikkeling van de planten, hetgeen tot uiting kwam in een verlaging van de opbrengst bij vroeg rooien.

Dr. H. J. DE FLUITER gaf naar aanleiding van zijn reis naar Canada een beeld van het op de laboratoria van „Science Service" verrichte onderzoek op entomologisch gebied. In verhouding tot andere landen blijken in Canada veel entomologen werkzaam te zijn. Aan fundamenteel onderzoek wordt een ruime plaats toebedeeld. Opgevallen was het echter, dat de verkregen gegevens betrekkelijk traag tot de met voorlichting belaste personen doordringen. Spreker toonde aan de hand van enkele voorbeelden aan op welke wijze men aldaar een onderzoek opzet en uitvoert. Leerzaam was geweest een bezoek aan twee fruitteeltproefstations in Oost- en West-Canada, die wat betreft klimaat en biosfeer onderling sterk verschilden en dan ook tot een totaal afwijkend spuitschema kwamen op grond van hun eigen proeven. Dit wijst er weer op dat de resultaten van buitenlandse gegevens zeer voorzichtig moeten worden gehanteerd, en generaliseren uit den boze is.

De vergadering hechtte voorts haar goedkeuring aan het voorstel van de voorzitter om het Bestuur te machtigen koninklijke goedkeuring op de nieuwe statuten aan te vragen.

Tot slot deelde de voorzitter mede dat de *Plantenziektendagen* 1957 gehouden zullen worden op 1 en 2 februari in de Aula van de Landbouwhogeschool te Wageningen.

DE SECRETARIS

Bij besluit van de algemene vergadering worden met ingang van 1 januari 1957 de volgende verhogingen van contributies en abonnementsgelden ingevoerd:

Contributie gewone leden, van f 6,— op f 7,50.

Min. bijdrage leden-donateurs, van f 10,— op f 12,50.

Abonnementsgeld, van f 8,50 op f 10,—.

Gaarne verzoeken wij de leden zo veel mogelijk *per giro* (zie inliggend briefje) te voldoen. Dit bespaart U en ons kosten en moeite!

De abonnees op het Tijdschrift over Plantenziekten wordt verzocht niet te gireren alvorens zij een nota hebben ontvangen.

DE PENNINGMEESTER